

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



TESIS

“Expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* bajo condiciones de estrés oxidativo, en células de *Yarrowia lipolytica* carentes del gen *CAT3*”

Por

Maricela Villarreal García

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Nutrición

DICIEMBRE, 2020

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



TESIS

**“Expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* bajo condiciones de
estrés oxidativo, en células de *Yarrowia lipolytica*
carentes del gen *CAT3*”**

Por:

MARICELA VILLARREAL GARCÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

Monterrey, NL.

DICIEMBRE, 2020

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA

**“EXPRESIÓN DE LOS GENES *CAT1* Y *CAT2* BAJO CONDICIONES DE
ESTRÉS OXIDATIVO, EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica*
CARENTES DEL GEN *CAT3*”**

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Presidente

Dr. Eduardo Campos Góngora

Secretario

Dr. Zacarías Jiménez Salas

Vocal

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Subdirección de Investigación, Innovación y Posgrado

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis **APROBÓ** la tesis titulada “**EXPRESIÓN DE LOS GENES *CAT1* Y *CAT2* BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO, EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica* CARENTES DEL GEN *CAT3***” presentada por la L.N. Maricela Villarreal García, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Dr. Eduardo Campos Góngora

Presidente

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Secretario

Dr. Zacarías Jiménez Salas

Vocal

DRA. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ
SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN, UANL
PRESENTE:

Nos permitimos comunicarle que hemos concluido la Dirección y Codirección de la tesis titulada **“EXPRESIÓN DE LOS GENES *CAT1* Y *CAT2* BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO, EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica* CARENTES DEL GEN *CAT3*”**, presentada por la L.N. Maricela Villarreal García, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto en particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Alere Flammam Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a 15 de diciembre de 2020

Dra. Blanca Edelia González Martínez
Directora

Dr. Eduardo Campos Góngora
Co-director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haber puesto en mi camino una experiencia personal y profesional que, sin duda, mejoró algunas de mis habilidades y capacidades, y que incluso hizo que surgieran algunas otras que no sabía que existían, además de darme la capacidad intelectual y emocional para sobrellevar algunos retos y dificultades que tuve durante mi formación, y por permitirme coincidir con diferentes personas, que me dejaron muchas enseñanzas.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Salud Pública y Nutrición, y al comité de la Maestría en Ciencias en Nutrición, por confiar en mí y darme la oportunidad de ingresar a un programa de posgrado de alta exigencia y calidad, así como a cada uno de los profesores que me compartieron de su conocimiento durante mi formación.

A los doctores Zacarías Jiménez Salas, Eduardo Campos Góngora y Heriberto Castro García, quienes me impulsaron y motivaron a ingresar al programa de la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme apoyo económico durante mi estancia en la maestría.

Al Dr. Eduardo Campos Góngora, por aceptarme en su equipo de trabajo y en su laboratorio, por su confianza, paciencia, tolerancia, enseñanzas, motivación, por su disposición al orientarme en este trayecto; gracias por disfrutar conmigo mis éxitos tras una serie de obstáculos y por formar parte de este logro académico.

A la Dra. Blanca Edelia González Martínez por confiar en mí, guiarme y orientarme en el desarrollo de este trabajo, así como por su disposición a escucharme para dar solución a algunos problemas, que se fueron presentando durante mi formación y por apoyarme de diferentes maneras.

A mis compañeros de laboratorio, Alejandra, Maripaz, Roberto, Mariela, Kim, Valeria, Priscilla, Ángel, Frank, Mariell y Lucia, a los MCN Gerardo, Abad, Sandra, Esther, Celeste y Clara y a mis compañeros de la 8ª generación de la MCN por su amistad, sabiduría y apoyo.

DEDICATORIA

A mi esposo:

Eliseo Aarón Rodríguez Tamez

A mis padres:

Juan Alfonso Villarreal Villarreal

Maricela García Guajardo

A mis hermanos:

Mayela Villarreal García

Juan Alfonso Villarreal García

Por darme la oportunidad de vivir esta experiencia personal y profesional, de no dejarme “tirar la toalla” en momentos difíciles y de recordarme que era capaz de realizar este trabajo de investigación cuando a veces lo dudaba...

Además de apoyarme siempre en alcanzar mis metas y objetivos, gracias por su paciencia, tolerancia, amor y comprensión...

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Principales oxidantes endógenos.	8
2	Características de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de genes.	34
3	Reactivos utilizados para una reacción de PCR en punto final.	35
4	Códigos de identificación de las secuencias utilizadas para el análisis múltiple de secuencias y para la construcción del árbol filogenético..	38
5	Valores de expresión de los genes <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i> .	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Cadena transportadora de electrones.	9
2	Mecanismo de acción de la enzima catalasa.	19
3	Esquema general de trabajo.	28
4	Comparación de la generación de ROS en células de <i>Y. lipolytica</i> (parental P01a y mutante Ylcat3-Δ) cultivadas en medio YPD con y sin exposición al agente oxidante H ₂ O ₂ .	40
5	Evaluación cualitativa de los ácidos nucleicos obtenidos de células de <i>Y. lipolytica</i> .	41
6	Evaluación de la efectividad del tratamiento con la enzima DNasa.	42
7	Imagen representativa de los productos de RT-PCR obtenidos para cada gen.	43
8	Expresión del gen <i>CAT3</i> en la cepa parental (P01a) de <i>Y. lipolytica</i> cultivada en medio YPD con y sin exposición al agente oxidante H ₂ O ₂ .	44
9	Expresión del gen <i>CAT1</i> en cepas parental (P01a) y mutante (Ylcat3-Δ) de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YPD con y sin exposición al agente oxidante H ₂ O ₂ .	45
10	Expresión del gen <i>CAT2</i> en cepas parental (P01a) y mutante (Ylcat3-Δ) de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YPD con y sin exposición al agente oxidante H ₂ O ₂ .	46
11	Patrón de expresión de los genes <i>CAT1</i> y <i>CAT2</i> en las cepas parental y mutante de <i>Y. lipolytica</i> con y sin inducción de estrés oxidativo.	47
12	Árbol filogenético construido a partir del alineamiento de secuencias múltiple de genes que codifican para catalasas en diferentes levaduras de diferentes especies.	49

LISTA DE SÍMBOLOS/ABREVIATURAS

Nomenclatura	Significado
[]	Concentración
°C	Grados Celsius
μl	Microlitros
CAT	Enzima catalasa
CAT	Gen que codifica para la enzima catalasa
DCF-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNAc	DNA complementario
DNAg	DNA genómico
g	Gramos
h	Horas
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
M	Concentración molar
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ^{·-}	Anión superóxido
OD	Densidad óptica
OD ₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
P01a	Cepa de la levadura <i>Yarrowia lipolytica</i>
pb	Pares de bases (<i>Pair bases</i>)
PBS	Buffer fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNA _m	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SOD	Enzima superóxido dismutasa
TA	Temperatura ambiente
URF	Unidades relativas de fluorescencia,
V	Voltios

Ylcat3- Δ Cepa mutante de la levadura *Yarrowia lipolytica* carente del gen *CAT3*.
YPD Medio de cultivo (*Yeast Peptone Dextrose*)

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Definición del problema.....	3
1.2 Justificación.....	5
II. HIPÓTESIS.....	6
III. OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo general.....	6
3.2 Objetivos específicos.....	6
IV. ANTECEDENTES.....	7
4.1 Estrés oxidativo.....	7
4.2 Daño a biomoléculas.....	10
4.2.1 Lípidos de membrana.....	10
4.2.2 Proteínas.....	11
4.2.3 Acido desoxirribonucleico.....	11
4.2.4 Carbohidratos.....	12
4.3 Estrés oxidativo y enfermedad.....	12
4.3.1 Obesidad.....	12
4.3.2 Diabetes.....	13
4.3.3 Enfermedades cardiovasculares.....	14
4.3.4 Cáncer.....	15
4.4 Mecanismos de defensa antioxidante.....	15
4.4.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	17
4.4.2 Glutation peroxidasa (GPx).....	17
4.4.3 Catalasa (CAT).....	18
4.5 Estrés oxidativo en levaduras.....	20
4.6 Regulación transcripcional de genes de la respuesta antioxidante.....	20
4.7 Levaduras como modelo de estudio.....	21
4.8 Respuesta de <i>Y. lipolytica</i> frente al estrés oxidativo.....	24
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
5.1 Material biológico.....	27

5.2 Métodos	27
5.2.1 Diseño del estudio	27
5.2.2 Procedimiento experimental	28
VI. RESULTADOS	40
6.1 Cuantificación de la generación de ROS en células de <i>Y. lipolytica</i>	40
6.2 Análisis de la expresión de genes	41
6.2.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	41
6.2.2 Evaluación del tratamiento con DNasa I	42
6.2.3 Obtención de DNA complementario (DNAc).....	43
6.2.4 Análisis de expresión de los genes <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i>	43
6.2.5 Análisis filogenético de las secuencias de los genes que codifican para catalasas en <i>Y. lipolytica</i> y en otras levaduras	48
VII. DISCUSIÓN.....	50
7.1 Generación de especies reactivas de oxígeno en células de <i>Y. lipolytica</i>	51
7.2 Expresión de los genes <i>CAT1</i> y <i>CAT2</i> en células de <i>Y. lipolytica</i>	53
7.3 Análisis de las secuencias que codifican para catalasa en <i>Y. lipolytica</i> y otras levaduras.....	56
VIII. CONCLUSIÓN.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas pequeñas y altamente reactivas; su cantidad está controlada por un sistema de defensa antioxidante, como en el que participa la catalasa. Cuando la generación de ROS, supera la capacidad de defensa antioxidante de la célula se produce estrés oxidativo, relacionado con el desarrollo de diversas patologías. Las levaduras son células eucariotas que pueden modificarse genéticamente y permiten comprender el papel funcional que tienen los genes ante diferentes condiciones. El objetivo de este estudio fue analizar si la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* se modifica en respuesta a condiciones de estrés oxidativo, en células de *Y. lipolytica* carentes del gen *CAT3* (Ylcat3-Δ). Se les indujo estrés oxidativo mediante la exposición al H₂O₂ (5 Mm) a células de las cepas parental y mutante (Ylcat3-Δ) de *Y. lipolytica* en fase de crecimiento exponencial. La generación de ROS se determinó por fluorimetría utilizando el fluoróforo DCF-DA y la expresión de los genes que codifican para las catalasas se analizó por RT-PCR.

La generación de ROS en las células parental y mutante sin exposición al agente oxidante fue similar; sin embargo, tras su exposición las células de la cepa parental produjeron menor cantidad de ROS, a diferencia de lo observado en las células de la cepa mutante carentes del gen *CAT3*. Contrariamente a la hipótesis planteada en este estudio, la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* no se afectó, independientemente de la presencia o ausencia del gen *CAT3*. Tras exponer a las células parental y mutante con el agente oxidante, la expresión del gen *CAT1*, disminuyó mientras que la expresión del gen *CAT2* aumentó; se ha descrito que la glucosa presente en el medio de cultivo, ejerce una acción inhibitoria en la actividad enzimática de la catalasa y a medida de que su disponibilidad en el medio disminuye dicha actividad aumenta; además las catalasas funcionan en conjunto con otros sistemas de defensa antioxidante, como parte de una respuesta robusta y múltiple frente al estrés oxidativo.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are small and highly reactive molecules; Its quantity is controlled by an antioxidant defense system, as in which catalase participates. When the generation of ROS, exceeds the antioxidant defense capacity of the cell, oxidative stress occurs, related to the development of various pathologies. Yeasts are eukaryotic cells that can be genetically modified and allow us to understand the functional role that genes have under different conditions. The aim of this study was to analyze whether the expression of the *CAT1* and *CAT2* genes is modified in response to oxidative stress conditions in *Y. lipolytica* cells lacking the *CAT3* gene (*Ylcat3-Δ*). Oxidative stress was induced by exposure to H₂O₂ (5 Mm) to cells of the parental and mutant strain (*Ylcat3-Δ*) of *Y. lipolytica* in exponential growth phase. The generation of ROS was determined by fluorimetry using the DCF-DA assay and the expression of the genes coding for catalases was analyzed by RT-PCR.

ROS generation in parental and mutant cells without exposure to the oxidizing agent was similar; however, after exposure, the cells of the parental strain produced a lower amount of ROS, in contrast to what was observed in cells of the mutant strain lacking the *CAT3* gene. Contrary to the hypothesis put forward in this study, the expression of the *CAT1* and *CAT2* genes was not affected, regardless of the presence or absence of the *CAT3* gene. After exposing the parental and mutant cells with the oxidizing agent, the expression of the *CAT1* gene decreased significantly while the expression of the *CAT2* gene increased; It has been described that the glucose present in the culture medium exerts an inhibitory action on the enzymatic activity of catalase and as its availability in the medium decreases, its activity increases; Furthermore, catalases work in conjunction with other antioxidant defense systems, as part of a robust and multiple response to oxidative stress.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición del problema

El estrés oxidativo es un mecanismo complejo, producido por la insuficiencia del sistema endógeno antioxidante para convertir a un exceso de moléculas inestables, denominadas radicales libres, a partículas menos dañinas (Forman & Torres, 2001; Santos-Sánchez et al., 2019). Los radicales libres interactúan con biomoléculas involucradas en la estructura y mecanismos celulares para estabilizar su configuración electrónica. Los cambios generados en las biomoléculas provocan alteraciones en la función de las membranas y proteínas, así como en la regulación de la expresión genética, propiciando a daños a nivel celular y, en consecuencia, al desarrollo de diferentes enfermedades.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son las especies reactivas más abundantes e importantes en los sistemas biológicos. La característica principal de las ROS es comportarse como oxidantes (Sosa et al., 2013; Valko et al., 2007). Para protegerse de los daños ocasionados por el estrés oxidativo, las células poseen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que constituyen sus mecanismos de defensa antioxidante.

En la levadura *Y. lipolytica*, la enzima que presenta mayor actividad enzimática frente al estrés oxidativo es la catalasa (Arinbasarova et al., 2015). En el genoma de *Y. lipolytica*, se han identificado seis genes que codifican para diferentes enzimas que participan en mecanismos de respuesta antioxidante (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2* y *GPx*). En estudios previos se determinó que el gen *CAT3*, fue el que mayores cambios de expresión presenta cuando las células se sometieron a condiciones de estrés oxidativo. (Desentis-Desentis, 2015; Miranda-Roblero, 2016). En un trabajo posterior se generó una cepa mutante de *Y. lipolytica*, por delección del gen *CAT3*, y se determinó que las características fenotípicas de *Y. lipolytica* (dimorfismo y crecimiento celular), no se afectaron cuando las células se sometieron a condiciones de estrés oxidativo (Quiñones-González, 2018).

Se ha descrito que en algunos organismos como *Candida glabrata*, que sólo tienen un gen que codifica para la enzima catalasa, las células mutantes carentes de este gen (*cta1-Δ*) mostraron una alteración en su crecimiento cuando se les indujo estrés oxidativo (Cuéllar-Cruz et al., 2008), por lo que se especula que en *Y. lipolytica* una especie que cuenta con al menos otro par de genes *CAT*, la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* estén compensando la función antioxidante de la enzima catalasa en las células de *Y. lipolytica* carentes del gen *CAT3*.

1.2 Justificación

El estrés oxidativo es un proceso que se ocasiona cuando la producción de radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno superan la capacidad antioxidante de la célula, ocasionando daños importantes a las diferentes biomoléculas. Durante la última década, diversas investigaciones han revelado que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, las cuales se encuentran entre las principales causas de muerte en el mundo (Marroco et al., 2017; Tan et al., 2018).

Los sistemas biológicos tienen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que están conservados en todos los organismos y permiten inactivar las ROS, a pesar de que la forma en cómo actúan difiera de especie a especie (Santos-Sánchez et al., 2019, Zamora, 2007).

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotas que han servido como modelo de estudio para investigaciones dirigidas a entender diversos mecanismos fisiológicos. Se estima que cerca del 60 % de las secuencias genéticas presentes en el genoma de las levaduras presentan una homología con el genoma del humano (Franssens et al., 2013).

Estudios derivados de nuestro grupo de investigación, han revelado que, ante la exposición a agentes oxidantes que produjeron condiciones de estrés oxidativo en células de *Y. lipolytica*, el gen *CAT3* fue el que mayores cambios tuvo en su expresión, por lo que se sugiere que la enzima codificada por este gen juega un papel fundamental en la respuesta celular antioxidante (Desentis-Desentis, 2015; Miranda-Roblero, 2016). Sin embargo, ante la exposición a condiciones de estrés oxidativo en células de *Y. lipolytica* con delección del gen *CAT3*, sus características fenotípicas (dimorfismo y crecimiento celular) no se afectaron (Quiñones-González, 2018), por lo que analizar el patrón de expresión de los otros genes que codifican para catalasa (*CAT1* y *CAT2*), permitirá indagar si éstos se encuentran expresados como mecanismo compensatorio ante la ausencia del gen *CAT3*.

II. HIPÓTESIS

La expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* en células de *Y. lipolytica* con delección del gen *CAT3* se modifica en respuesta a condiciones de estrés oxidativo.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* en células de *Y. lipolytica* carentes del gen *CAT3* (*Ylcat3-Δ*), en condiciones de estrés oxidativo.

3.2 Objetivos específicos

1. Comparar la producción de ROS en la cepa mutante *Ylcat3-Δ* y la cepa parental P01a, en condiciones de estrés oxidativo.
2. Analizar los patrones de expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* en las cepas mutante *Ylcat3-Δ* y parental P01a, sometidas a estrés oxidativo.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un proceso complejo en el que existe un desequilibrio entre la generación de moléculas oxidantes y la actividad endógena del sistema antioxidante de las células (Forman & Torres, 2001; Santos-Sánchez et al., 2019).

Un átomo se considera termodinámicamente estable, cuando en cada uno de sus orbitales existe un mínimo de dos electrones apareados. Cuando en el orbital más externo, existe uno o más electrones no apareados, los átomos se convierten en moléculas pequeñas, difusibles y altamente reactivas, denominadas radicales libres (Forman & Torres, 2001; Ligouri et al., 2018; Phaniendra et al., 2015). La inestabilidad de los radicales libres caracterizada por una alta reactividad química, promueve que éstos interactúen rápidamente con otros átomos o moléculas a través de la donación (oxidación) o aceptación (reducción) de sus electrones, con el objetivo de estabilizar su último orbital; sin embargo, dichas interacciones promueven la generación de nuevos radicales libres. La generación de estas moléculas se detiene cuando dos radicales libres estabilizan sus orbitales externos mediante la unión covalente de sus electrones (Sepúlveda-Reis et al., 2008).

Las principales especies reactivas son radicales clasificados por el átomo principal que conforma la molécula: especies reactivas de oxígeno (ROS), de nitrógeno (RNS), de azufre (RSS) y de cloro (RCS), siendo las ROS las especies reactivas más abundantes e importantes en los sistemas biológicos y cuya característica principal es comportarse como oxidante (Sosa et al., 2013; Valko et al., 2007). Las ROS pueden encontrarse en diferentes formas moleculares, como el anión superóxido (O_2^-), perhidroxilo (HOO^-), hidroxilo ($\bullet HO$), peroxilo (ROO^-) y alcoxilo (RO^-) (tabla 1); existen otras formas intermedias que no son radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e hidroperóxido orgánico ($ROOH$) (Ojaimi et al., 2010).

Tabla 1. Principales oxidantes endógenos

Oxidante	Fórmula	Ecuación de la reacción
Anión superóxido	$O_2^{\cdot -}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot -} + H^+$ $2O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	$Hipoxantina + H_2O + O_2 \rightleftharpoons xantina + H_2O_2$ $Xantina + H_2O + O_2 \rightleftharpoons \text{ácido úrico} + H_2O_2$
Radical hidroxilo	$\cdot OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$
Ácido hipocloroso	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radical peroxilo	ROO^{\cdot}	$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$
Radical hidroperoxilo	HOO^{\cdot}	$O_2^{\cdot -} + H_2O \rightleftharpoons HOO^{\cdot} + OH^-$

Fuente: Birben et al. (2012)

Las ROS pueden generarse por fuentes endógenas y exógenas. Las fuentes endógenas de ROS, se derivan de la actividad de diferentes organelos cuyo consumo de oxígeno es alto, tales como la mitocondria, los peroxisomas y el retículo endoplásmico (Phaniendra et al., 2015).

La fuente endógena principal de ROS en las células eucariotas es generada en la cadena transportadora de electrones (en la mitocondria), sin embargo, existen otras fuentes endógenas de radicales libres generadas durante el plegamiento de proteínas, la formación de enlaces disulfuro en el retículo endoplasmático, el metabolismo de los fármacos o xenobióticos por las enzimas del citocromo P450 y los neutrófilos, macrófagos y eosinófilos (Brieger et al., 2012; Chang & Chuang, 2010; Kawahito et al., 2009; Rahman, 2007).

Entre los factores exógenos que también promueven la producción de los radicales libres están la radiación solar (rayos ultravioleta), los procesos fisiopatológicos de alguna enfermedad, intoxicación química y presencia de contaminantes, pesticidas etc. en los alimentos o en el ambiente (Santos-Sánchez et al., 2019).

La respiración celular en organismos eucariotas es esencial para la vida, ya que, a partir de nutrientes como la glucosa y los ácidos grasos, las reacciones aeróbicas de oxidación-reducción (redox) generan mayor producción de ATP, en comparación con procesos anaeróbicos (McKee & McKee, 2015). La formación de coenzimas NADH o FADH₂ procedentes de la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, y de la oxidación de los ácidos grasos, transfieren sus electrones a

través la cadena transportadora de electrones, conformada por una serie de complejos enzimáticos ubicados en la membrana mitocondrial interna (Complejo I: NADH: ubiquinona reductasa, Complejo II: succinato deshidrogenasa, Complejo III: ubiquinol ferrocitocromo c oxidorreductasa, Complejo IV: citocromo c oxidasa), y, al final de este proceso el oxígeno funge como aceptor final de estos electrones (Figura 1). A medida que se da este flujo de electrones por los diferentes complejos, se genera un gradiente electroquímico que permite el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal donde se acumulan y regresan hacia la matriz mitocondrial a favor de su gradiente de concentración a través de una enzima transmembrana denominada ATPasa, generando con ello ATP a partir de la unión de una molécula de ADP y P_i (Mckee & McKee, 2015; Ndisang, 2010).

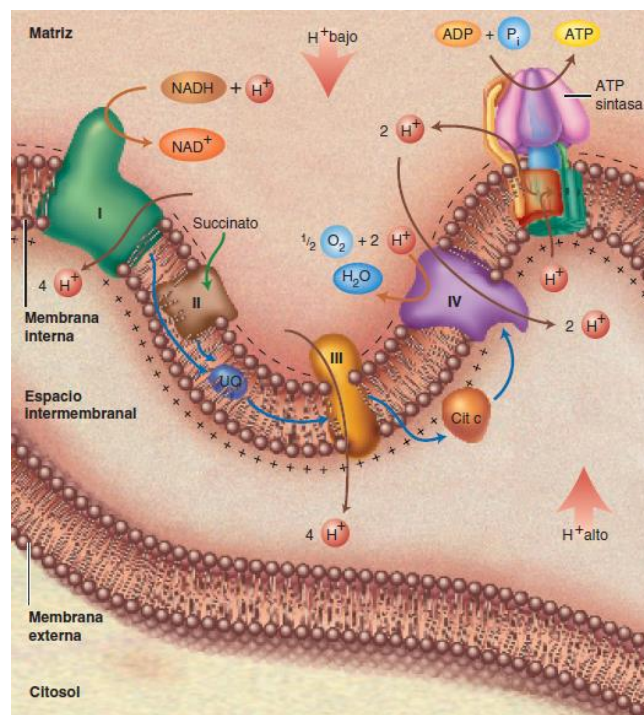


Figura 1. Cadena transportadora de electrones. Fuente: Mckee & McKee (2015)

Las ROS están involucradas en diferentes procesos fisiológicos esenciales para los organismos aeróbicos ya que en cantidades controladas, actúan como señalizadores celulares que modifican el estado redox de proteínas diana de diferentes enzimas metabólicas, componentes del citoesqueleto, proteínas

reguladoras del ciclo celular, factores de transcripción, reguladores de la traducción, fosforiladores de proteínas, además de funcionar como segundo mensajero en procesos como el crecimiento, diferenciación, proliferación y apoptosis celular (Madamanchi & Runge, 2005; McKee & McKee, 2015; Patlevic et al., 2016).

Sin embargo, cuando la concentración de las ROS es alta, éstas son capaces de reaccionar con moléculas orgánicas, produciendo modificaciones adversas a los componentes de la célula como los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos, alterando sus funciones y ocasionando daños a nivel celular y tisular, conduciendo al desarrollo de diferentes enfermedades (Barbosa et al., 2008; Birben et al., 2012; Rahman, 2007). A pesar de que el H_2O_2 no es tan reactivo, su interacción con el hierro o el cobre lo transforma a $\bullet\text{OH}$, el cual causa diversos daños al DNA (Yazgan & Krebs, 2012).

4.2 Daño a biomoléculas

4.2.1 Lípidos de membrana

Las principales moléculas afectadas por la presencia de las ROS son los ácidos grasos poliinsaturados, que forman parte de las membranas plasmáticas de las células. La reacción entre un radical hidroxilo y uno de los carbonos flanqueados por dobles enlaces de la cadena de un ácido graso poliinsaturado, promueve la abstracción de una molécula de hidrógeno del grupo metileno (CH_2) formando un radical alquílico. El producto de la reacción entre un radical alquílico con el oxígeno, es el radical peroxilo (LOO^\bullet) que, al reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, generan otros radicales (hidroperóxido o lipoperóxido), produciendo una reacción en cadena de daño creciente a la membrana celular (Céspedes-Miranda & Castillo-Herrera, 2008). El proceso de peroxidación altera la permeabilidad de la célula, incapacitándola de realizar procesos vitales como los sistemas de transporte activo y pasivo, además de producir compuestos aldehídos como el malondialdehído (MDA) Y 4-hidrozinonenal (4HNE), generando modificaciones covalentes en los grupos

funcionales de las macromoléculas (Ayala et al., 2014; González-Torres et al., 2000; Pisoschi & Pop, 2015; Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013).

4.2.2 Proteínas

Las ROS pueden inducir a la fragmentación de las proteínas, derivada de los entrecruzamientos covalentes entre el radical hidroxilo con los aminoácidos aromáticos, los enlaces peptídicos y disulfuro (González-Torres et al., 2000). Las proteínas poseen grupos funcionales que pueden sufrir modificaciones a partir de la oxidación en los grupos sulfhidrilo y en las proteínas constituidas por aminoácidos como metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina e histidina, generan proteínas carboniladas en las que se incrementa la glucosilación, predisponiéndolas a procesos de proteólisis, desnaturalización o incluso pérdida de su función biológica (Ramos-Ibarra et al., 2006).

La oxidación de la cadena lateral de las proteínas puede ocasionar daños que impactan procesos a nivel funcional como la inhibición enzimática, el aumento de la proteólisis, la alteración de la inmunogénesis, así como su plegamiento (Pisoschi & Pop, 2015; San-Miguel & Martin-Gil, 2009).

4.2.3 Acido desoxirribonucleico

El DNA, es una molécula muy susceptible a daños estructurales ocasionados por las ROS ya que éstas pueden producir modificaciones en las secuencias de azúcar fosfato o en las bases nitrogenadas (purinas o pirimidinas) dando lugar a mutaciones, carcinogénesis, así como impactar en la expresión de un gen determinado y por lo tanto, en la síntesis de proteínas, por daño a un gen específico; además, pueden ocasionar rupturas de una o de doble cadena en el DNA (San-Miguel & Martin-Gil, 2009; Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013; Smith et al., 2013; Zorrilla-García et al., 2004).

4.2.4 Carbohidratos

Las ROS pueden romper los enlaces glucosídicos de algunos polisacáridos, como los glucosaminoglucanos; principalmente por su reacción con los radicales anión superóxido e hidroxilo que alteran su estructura, conduciendo al desarrollo de algunas patologías inflamatorias (González-Torres et al., 2000). Además, la ruptura de los enlaces glucosídicos desencadena daños biológicamente importantes en la estructura de los carbohidratos relacionados con diversas funciones, tales como aquellos que participan como receptores celulares a estímulos hormonales y neurotransmisores, las actividades de interleucinas y la formación de prostaglandinas (Amir-Aslani & Ghobadi, 2016).

Los mecanismos derivados del estrés oxidativo como el daño a biomoléculas, la inducción de la actividad de citosinas proinflamatorias y la inducción de algunas vías de señalización, han sido asociados con procesos fisiopatológicos y de envejecimiento e implicados en la obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis y el cáncer (Pitocco et al., 2010).

4.3 Estrés oxidativo y enfermedad

Durante la última década, diversas investigaciones han descrito la estrecha asociación entre el desarrollo de enfermedades como la artritis, diabetes, demencia, cáncer, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, obesidad, osteoporosis y síndrome metabólico con el estrés oxidativo (Marroco et al., 2017; Tan et al., 2018). A continuación, se describe la relación del estrés oxidativo con algunas de estas enfermedades.

4.3.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad caracterizada por una acumulación excesiva de grasa; además de ser reconocida como un factor de riesgo importante en la patogénesis de varias enfermedades (Kaila & Raman, 2008). Recientemente se ha descrito que la obesidad está relacionada con una inflamación sistémica

crónica de bajo grado, en donde existen altos niveles de proteínas de fase aguda y citosinas inflamatorias activas (León-Pedroza et al., 2015).

La hiperplasia de los adipocitos en la obesidad está acompañada por un aumento en la inflamación y la infiltración de macrófagos inflamatorios dentro del tejido adiposo (Dludla et al., 2018). Durante los procesos inflamatorios se activan células fagocíticas como los neutrófilos y macrófagos, que generan grandes cantidades de ROS y otras especies reactivas; en condiciones patológicas se generan cantidades elevadas de ROS que pueden difundirse dentro de las células fagocíticas induciendo a estrés oxidativo localizado y daño tisular; además de esta respuesta, otras células pueden producir especies reactivas por la presencia de citosinas proinflamatorias (Biswas, 2016). Algunas enfermedades crónicas derivadas de las complicaciones de la obesidad (síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y cáncer) están asociadas con el estrés oxidativo, por lo que se ha especulado que la inflamación del tejido adiposo tiene una gran relación en la patogénesis y las complicaciones relacionadas con la obesidad (Xu et al., 2003).

4.3.2 Diabetes

Tanto las ROS mitocondriales como las no mitocondriales contribuyen al estrés oxidativo durante la diabetes mellitus. El aumento de los niveles de glucosa en la diabetes promueve un incremento de la glucólisis, y a su vez de piruvato, lo cual intensifica el potencial de la membrana mitocondrial, conduciendo a una disfunción mitocondrial y una sobreproducción de ROS en la cadena transportadora de electrones (Phaniendra et al., 2015).

El estrés oxidativo puede inducir hiperglucemia por medio de diferentes mecanismos, como la vía del poliol, en la que la enzima aldosa reductasa agota las cantidades de NADPH (esencial para la actividad de la enzima glutatión reductasa) para convertir el exceso de glucosa en sorbitol. Además, cuando el sorbitol es convertido en fructosa, se producen moléculas de NADPH, cuyo metabolismo incrementa la generación de ROS por medio de la vía NADPH

oxidasa (Matsuda & Shimomura, 2013). La presencia de ROS puede deteriorar las células β pancreáticas, reduciendo la liberación de insulina; además las ROS activan muchas vías metabólicas, como la NADPH y la xantina oxidasa que pueden originar el desarrollo de resistencia a la insulina (Furukawa et al., 2004; Ma et al., 2018).

La formación de radicales libres en la diabetes, derivada de la glicación no enzimática de proteínas, oxidación de la glucosa y un incremento en la peroxidación lipídica, generan daño a la célula y también incrementan la resistencia a la insulina como consecuencia del estrés oxidativo generado (Asmat et al., 2016). Se ha propuesto que uno de los factores más importantes en la fisiopatología de las complicaciones de la diabetes, es el estrés oxidativo (Lazo-de-la-Vega-Monroy & Fernández-Mejía, 2012).

4.3.3 Enfermedades cardiovasculares

El estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Zuo et al., 2019). Estudios recientes han reportado que la sobreproducción de ROS puede causar infarto al miocardio y aterosclerosis (Moris et al., 2017).

Las enfermedades como la dislipidemia y la hipertensión, promueven cambios en las células endoteliales, provocando la adhesión de moléculas quimiotácticas además de incrementar la permeabilidad de las macromoléculas. Dichas modificaciones facilitan el ingreso de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) dentro de la pared arterial (Senoner & Dichtl, 2019). Las LDL pueden oxidarse en la etapa inicial de la aterogénesis, lo que activa una respuesta endotelial y del sistema inmune dentro de la íntima arterial. Las LDL oxidadas son fagocitadas por los macrófagos, los cuales liberan ROS y marcadores pro-inflamatorios que a su vez promoverán la oxidación de otras moléculas LDL (Zuo et al., 2019).

La disfunción endotelial puede atribuirse a la presencia de ROS producidas en la mitocondria por la cadena transportadora de electrones. En condiciones normales, la liberación del óxido nítrico (NO) juega un papel importante en la

regulación de la función endotelial; sin embargo, el incremento de los niveles de ROS, puede promover la oxidación del NO, generando peroxinitrito, que a su vez participará en procesos oxidativos y de daño celular (Zuo et al., 2019).

4.3.4 Cáncer

Debido al incremento de la demanda energética derivada de procesos de crecimiento y proliferación celular, el metabolismo de las células cancerosas está alterado, produciendo más ROS con respecto a las células normales para mantener actividades subcelulares como las transducciones de señales y la expresión de genes (Zuo et al., 2019). La inestabilidad genética, metabólica y microambiental de las células cancerosas son factores que promueven niveles elevados de ROS (Kumari et al., 2018), por lo que se ha mencionado que la alteración y el desequilibrio de la señalización redox presentes en el cáncer, podría estar implicada en la malignidad y en la resistencia a los medicamentos (Kumari et al., 2018).

Mientras que las ROS pueden contribuir a la progresión del cáncer, el estrés oxidativo procedente de la disfunción mitocondrial puede inducir la apoptosis celular. En la especie humana, las células cancerosas tienen mecanismos de protección frente a los niveles elevados de ROS a través de la sobreexpresión de factores de transcripción antioxidantes tales como el factor nuclear derivado de eritroide 2 (NRF2) mediante la expresión de oncogenes (K-Ras, B-Raf, c-Myc) (Zuo et al., 2019).

4.4 Mecanismos de defensa antioxidante

Los mecanismos de defensa contra los radicales libres, inducidos por el estrés oxidativo involucran: mecanismos preventivos y de reparación, así como defensas físicas y antioxidantes (Valko et al., 2007). Un antioxidante es una sustancia que a bajas concentraciones retrasa o impide la oxidación de un sustrato celular (Matés, 2000; Santos-Sánchez et al., 2019). La función principal de un antioxidante consiste en prevenir o detectar una cadena de propagación

oxidativa, a través de la estabilización del radical inestable, reduciendo el daño oxidativo (Santos-Sánchez et al., 2019).

Los sistemas biológicos tienen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos conservados en todas las especies cuya función es inactivar las ROS (Santos-Sánchez et al., 2019; Zamora, 2007).

El sistema antioxidante exógeno no enzimático está conformado por nutrientes provenientes de la dieta como las vitaminas liposolubles (A y E) e hidrosolubles (C), minerales como el selenio y el zinc, así como por compuestos fenólicos (Amir-Aslani & Ghobadi, 2016). Además, existen compuestos naturales presentes en las plantas con actividad antioxidante denominadas fitoquímicos como los flavonoides las cuales se dividen en flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y flavan-3-oles (Kumar & Pandey, 2013). Dichos compuestos tienen la capacidad de neutralizar a los radicales libres, reduciendo la peroxidación lipídica y protegiendo a la célula de la apoptosis (Sánchez-Rodríguez et al., 2016).

El glutatión (GSH) forma parte del sistema antioxidante no enzimático generado por las células, que actúa sobre la permeabilidad de la membrana y el transporte de aminoácidos, además de intervenir en el proceso de apoptosis y síntesis de proteínas (Bonola-Gallardo et al., 2014; Kumar & Pandey, 2013; Nimse & Pal, 2015).

El mecanismo de acción del sistema antioxidante endógeno, tanto en células procariotas como en eucariotas consiste en una serie de reacciones enzimáticas llevadas a cabo por enzimas tales como superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT) y glutatión peroxidasas (GPx), las cuales minimizan el daño celular y tisular a causa de las ROS (Akin et al., 2015; González-Gil et al., 2013; Lushchak, 2006; Zamora, 2007).

4.4.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Las SOD pertenecen a una familia de metalo-enzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y oxígeno. De acuerdo al metal presente en su sitio activo (cobre y zinc; manganeso y níquel), en animales y hongos hay tres tipos de SOD (Bartosz, 2005; Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; González-Torres et al., 2000). Las enzimas MnSOD (situada en la matriz mitocondrial) y Cu-ZnSOD (ubicada en el citosol), se encuentran en la mayoría de los organismos eucariotas (Venereo-Gutiérrez, 2002). En los humanos se ha reportado que la deficiencia de cobre o de zinc ocasiona la inactividad de SOD y podría ocasionar enfermedades relacionadas con el déficit de atención e hiperactividad en niños y aquellas patologías que comprometen al sistema inmune (Estrada-Carrasco et al., 2010; Russo, 2010).

4.4.2 Glutathion peroxidasa (GPx)

La GPx es una enzima selenio-dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y lipoperóxido ($LOOH^{\cdot}$) utilizando como agente reductor al glutatión (GSH) en su estado no reducido; una vez que el glutatión es oxidado (GSSG) vuelve a reducirse por la acción de la enzima glutatión reductasa, regresando a su estado original (González-Torres et al., 2000; Venereo-Gutiérrez, 2002). De acuerdo con su afinidad de sustrato, las GPx se clasifican en tres grupos: GPx-c (mayor afinidad por H_2O_2), GPx-p (misma afinidad por H_2O_2 y $LOOH^{\cdot}$) y GPx-PH (mayor afinidad por $LOOH^{\cdot}$). Se ha identificado que la enzima GPx se encuentra en el citosol de los eritrocitos y en los lisosomas de neutrófilos y macrófagos (Nimse & Pal, 2015; Venereo-Gutiérrez, 2002).

El consumo en cantidades adecuadas de selenio y riboflavina, así como de cobre y zinc, es indispensable para la transcripción de los genes que codifican para las enzimas SOD y GPx, respectivamente (Zamora, 2007).

4.4.3 Catalasa (CAT)

Las catalasas (CAT) son enzimas metaloproteínas tetraméricas intracelulares presentes en la mayoría de las células aerobias (Kirkman & Gaetani, 2006) que se mantienen unidas por interacciones no covalentes y cuyo peso molecular oscila entre los 210 – 280 kiloDalton (kDa). Las subunidades de esta enzima están compuestas de un grupo prostético de protoporfirina IX (Bartosz, 2005; Sari et al., 2006).

Las catalasas que tienen en su sitio activo un grupo hemo y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), son las más abundantes tanto en células procariotas como en eucariotas. Las catalasas-hemo se dividen en monofuncionales y peroxisomales y ambas participan en el sistema CAT/SOD, neutralizando la reactividad de las ROS y de esta forma protegen del daño oxidativo a biomoléculas como el DNA, las proteínas y los lípidos (Beltrán-García et al., 2006; Estrada-Carrasco et al., 2010). Además, se ha descrito que las catalasas con el grupo hemo, tienen roles importantes en procesos inflamatorios, mutagénicos y preventivos de mecanismos de apoptosis (Jamieson, 1998).

A nivel celular, la enzima catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, organelo con altos niveles de ROS; aunque también pueden encontrarse en la mitocondria y en el citosol (Veal et al., 2007). Esta enzima cataliza la eliminación del H_2O_2 , evitando la formación de algunas moléculas reactivas como el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (Alfonso-Prieto et al., 2009; Díaz, 2003). La eliminación del H_2O_2 ocurre en dos fases: en la fase I (Figura 2a) se forma el compuesto intermediario (compuesto I), a partir de la oxidación de una catalasa por una molécula de H_2O_2 . En la fase II (Figura 2b), la catalasa regresa a su estado original como producto de la reducción de una segunda molécula de H_2O_2 y el compuesto I.

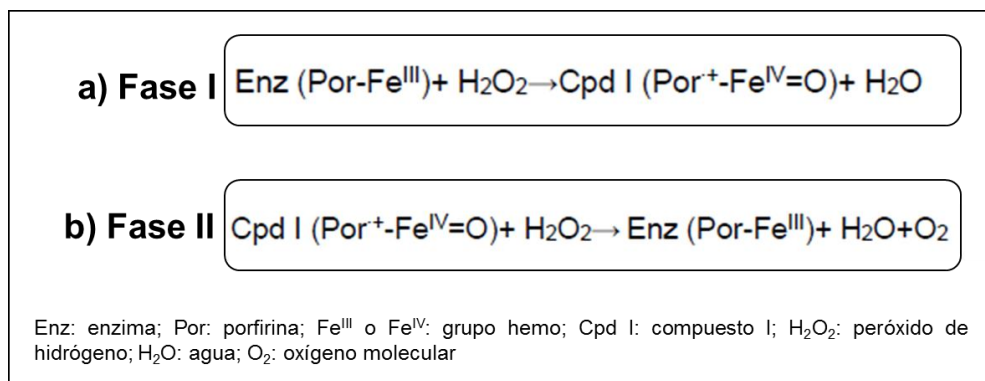


Figura 2. Mecanismo de acción de la enzima catalasa
Adaptado de: Alfonso-Prieto et al. (2009)

Las catalasas se ubican principalmente en organelos como los peroxisomas y las mitocondrias, aunque también existen catalasas citosólicas (Gómez et al., 2019). Christian de Duve en 1965, definió el término “peroxisoma”, como aquellos organelos celulares que contienen al menos una oxidasa productora de H_2O_2 y una catalasa (Fransen et al., 2012). En los mamíferos, los peroxisomas juegan un papel clave en algunas vías metabólicas como la β oxidación, además de contener varias enzimas que producen H_2O_2 como parte de su ciclo normal catabólico, como la acil-CoA oxidasa. Debido a su metabolismo oxidativo, los peroxisomas son considerados como una fuente de estrés oxidativo (Schrader & Fahimi, 2006). Sin embargo, los peroxisomas también responden al estrés oxidativo y al ROS, para proteger a la célula contra el daño oxidativo, con enzimas como la catalasa que actúa contra los efectos tóxicos del H_2O_2 generado en los peroxisomas y eliminándolo con una gran eficiencia.

La levadura *S. cerevisiae* posee dos isoformas de catalasa, codificadas por diferentes genes, una catalasa A (*CTA1*) ubicada en los peroxisomas y una catalasa T (*CTT1*), localizada en el citosol (Martins & English, 2014), que son regulados de forma diferencial, mientras que el gen *CTT1* se estimula por el H_2O_2 exógeno, el gen *CTA1* se regula por el metabolismo de los ácidos grasos (Semchyshyn, 2009).

4.5 Estrés oxidativo en levaduras

Las levaduras están expuestas a diferentes tipos de ROS, derivadas de condiciones ambientales inadecuadas, como el déficit de algún nutriente, pH, oxígeno y temperaturas no adecuadas, así como la presencia de algunas sustancias (alcoholes y metales pesados) (Jiménez-Bremont et al, 2012). Con el objetivo de mantener un equilibrio entre la producción y la destrucción de los radicales libres en la célula, estos organismos poseen un complejo sistema que emite mecanismos de retroalimentación, a través del uso de proteínas que sensan y reconocen a las moléculas oxidantes. Una vez que las proteínas son activadas por los agentes oxidantes, diferentes genes comienzan a transcribirse (entre ellos los que codifican para enzimas involucradas en la respuesta antioxidante como: catalasas, superóxido dismutasas y glutatión peroxidasa).

El proceso por el cual las células combaten a las moléculas oxidantes, se ha descrito en diferentes tipos de células, sin embargo, tanto la respuesta adaptativa al estrés oxidativo, así como las señales de traducción se han comprendido mejor utilizando como modelo de estudio a las levaduras (Lushchak, 2010).

4.6 Regulación transcripcional de genes de la respuesta antioxidante

Ante la presencia de ROS, las células eucariotas poseen un sistema que emite señales que migran desde el citosol hacia el núcleo, con el objetivo de regular la actividad de los genes involucrados en mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo (Lushchak, 2014). Diferentes mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, permiten la adaptación de las células ante las condiciones oxidantes, contrarrestando los posibles daños a las biomoléculas causados por el estrés oxidativo (Molina-Navarro et al., 2008). En las levaduras, la respuesta al exceso de ROS, generado por la exposición al calor, la inanición y al estrés osmótico, pueden activar o reprimir tanto factores de transcripción específicos de respuesta al estrés oxidativo (Yap1p y Skn7p), como los factores de respuesta general al estrés (Msn2p y Msn4p) entre otros. En la levadura *S. cerevisiae*, se ha descrito que el control de la expresión de los genes que codifican para

enzimas de defensa antioxidante, en algunas ocasiones requiere más de un factor de transcripción (Aung-Htut et al., 2012).

Las enzimas del sistema de defensa antioxidante (SOD, CAT y GPx), tienen mecanismos distintos para eliminar el exceso de ROS o reparar el daño ejercido por éstas, dependiendo del compartimento celular. Tales mecanismos son también distintos en las diferentes especies. Se ha descrito que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee dos catalasas codificadas por diferentes genes (*CTA1* y *CTT1*), ubicadas en los peroxisomas (catalasa A) y el citosol (catalasa B), respectivamente. La activación de la expresión de estos genes responde a estímulos diferentes; mientras que el oxígeno y los ácidos grasos inducen a *CTA1*, el *CTT1* es inducido por diferentes factores como el oxígeno, calor, estrés osmótico y oxidativo, así como por iones de cobre (Jamieson, 1998; Nishimoto et al., 2015).

Además, *S. cerevisiae* también posee dos enzimas SOD, transcritas por los genes *SOD1* y *SOD2*, cuya expresión se induce ante condiciones como el crecimiento celular en sustratos no fermentables, el oxígeno o agentes generadores de superóxido. Además, este organismo también tiene 3 genes GPx-; mientras que uno es regulado por la glucosa en condiciones de inanición, el otro es regulado por estrés oxidativo (*GPX1* y *GPX2*, respectivamente), y de manera interesante, el gen *GPX3* ha sido descrito como un gen constitutivo (Aung-Htut et al., 2012).

En la levadura *Y. lipolytica* se han identificado 3 genes que codifican para catalasas (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*), dos que transcriben a las enzimas superóxido dismutasa (*SOD1* y *SOD2*) y uno que codifica para glutatión peroxidasa (GPX) (Desentis-Desentis, 2015).

4.7 Levaduras como modelo de estudio

Las levaduras se distribuyen entre los phylum *Ascomycota* y *Basidiomycota* del reino de los hongos. Se ha reportado que existen más de 15,000 especies de

levaduras en el planeta, de los cuales 149 géneros y aproximadamente 1,500 especies ya han sido caracterizadas (Kurtzman et al., 2011; Lachance, 2006).

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotas, que han servido como modelo de estudio para investigaciones dirigidas a entender diversos mecanismos como la división celular, el uso de sustratos hidrofóbicos, la biogénesis mitocondrial y peroxisomal, la señalización por pH, procesos de autofagia, interacciones genéticas, cambios transcripcionales, la replicación y la reparación del daño del DNA, el plegamiento, secreción e interacción de proteínas, el transporte intracelular y el metabolismo, entre otros (Enserink, 2012; Lachance, 2006; Pereira et al., 2012; Tenreiro & Outeiro, 2010).

Algunas de las ventajas experimentales que tienen las levaduras como modelo de estudio, con respecto a otras líneas celulares es que son organismos de fácil manipulación, tienen una tasa elevada de crecimiento con requerimientos nutricionales mínimos y cuando las condiciones nutricionales son apropiadas en las levaduras, éstas tienen la capacidad de duplicarse cada 90 min (Cabrales-Arellano, 2012). Sin embargo, las levaduras presentan algunas limitaciones o desventajas, ya que carecen de interacciones complejas que ocurren en organismos pluricelulares superiores; no obstante, comparten características fundamentales con una célula eucariota, ya que cerca del 60 % de sus secuencias genéticas presentan homología con el genoma humano (Franssens et al., 2013).

Los primeros modelos experimentales en los que se utilizó como modelo de estudio a las levaduras, iniciaron en 1844, donde éstos permitieron al laboratorio de Carlsbeg (Copenhague, Dinamarca), comprender mecanismos del ciclo celular. En el siglo XIX, el uso de estos organismos revolucionó diferentes procesos a nivel industrial, en áreas como la farmacéutica (síntesis de antibióticos y enzimas), cervecera, panadera y biotecnológica. Además, su uso como modelo experimental en 1990, facilitó la identificación del blanco farmacológico de la rapamicina; ante estos hallazgos, se ha admitido utilizar a las levaduras como modelo de estudio para identificar los mecanismos de acción de

otros compuestos clínicamente relevantes, extrapolando los hallazgos a especies eucariotas superiores, en la escala evolutiva (Enserink, 2012).

El género *Yarrowia* es una de las levaduras no convencionales de la clase *hemiascomycetes* (Lachance, 2006). La levadura *Y. lipolytica*, es un organismo no patógeno, ampliamente distribuido en la naturaleza (por la facilidad de crecer en alimentos con alto contenido lipídico y campos petroleros) y es considerado como seguro por la FDA; de acuerdo con las características de crecimiento, en las que se encuentre, este organismo tiene la capacidad de crecer en forma de levadura o micelio (dimorfismo) (Barth & Gaillardin, 1997; Cabrales-Arellano, 2012; Richard et al., 2005).

Tanto para el ciclo de crecimiento como para el metabolismo adecuado de las células, *Y. lipolytica* requiere de oxígeno (en concentraciones adecuadas, ya que al ser un organismo aeróbico es muy sensible a este factor) y una temperatura ideal (28 °C) (Fickers et al., 2011). Algunas de las ventajas de *Y. lipolytica* al ser utilizada como modelo de estudio son, que es una levadura fácilmente manipulable con técnicas de genética clásica y biología molecular, varios de sus procesos fisiológicos y bioquímicos, son similares a los de otras células eucariotas, incluso los de organismos superiores como las plantas y los animales, así como aquellos involucrados en la respuesta al estrés oxidativo (Farrugia & Balzan, 2012; Kerscher et al., 2001); además, su genoma está completamente secuenciado y se encuentra disponible en algunas plataformas científicas (Mauersberger et al., 2001).

Tras secuenciar el genoma completo de *Y. lipolytica*, el Consorcio Francés Genolevoures determinó, que éste tiene un tamaño aproximado de 12.7 – 22.1 Mb y que está organizado en 6 cromosomas denominados A, B, C, D, E y F (Cabrales-Arellano, 2012; Liu et al., 2015).

Debido a las consecuencias negativas del estrés oxidativo, derivadas de la afección de diversos procesos celulares, que implican la generación y el desarrollo de diferentes enfermedades, la supervivencia y la muerte celular, las levaduras se han convertido en un modelo experimental ideal para analizar el

estrés oxidativo, ya que el uso de estos organismos ha permitido comprender algunos procesos implicados en el desarrollo de enfermedades y los mecanismos de respuesta antioxidante, generado por el daño al DNA (Breitenbach et al., 2013 ; De-la-Torre-Ruiz et al., 2015; Franssens et al., 2013).

4.8 Respuesta de *Y. lipolytica* frente al estrés oxidativo

En células de *Y. lipolytica* expuestas a sustancias que inducen un estado de estrés oxidativo, se ha observado que la protección en contra de las ROS no es exclusiva de las enzimas de defensa antioxidante (catalasa y superóxido dismutasa), ya que participan algunas otras enzimas que no están relacionadas de forma directa con la intercepción de los radicales libres como la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y la glutatión reductasa (Arinbasarova et al., 2015).

La comparación de la actividad enzimática antioxidante en células de 2 especies de levaduras (*Y. lipolytica* y *Pichia pastoris*) creciendo en fase exponencial y sometidas a estrés oxidativo por diferentes agentes oxidantes, demostró que las células de *Y. lipolytica* fueron más resistentes que las de *Pichia pastoris* al estrés oxidativo, lo que indica una respuesta antioxidante más robusta. También se encontró que la actividad enzimática de la catalasa es mayor en *Y. lipolytica* en comparación a la actividad de la catalasa de la otra levadura (Lopes et al., 2013).

Biryukova y cols. (2006), indujeron estrés oxidativo a las células de *Y. lipolytica* con diferentes sustancias oxidantes, con el objetivo de identificar los cambios en la actividad de diferentes enzimas tales como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Se demostró que el número de células que sobrevivió fue superior en la fase de crecimiento estacionaria (con respecto a las de la fase exponencial) ante condiciones de estrés oxidativo, además, un pre tratamiento de 60 minutos durante la fase de crecimiento logarítmica con concentraciones no letales de las sustancias oxidantes, promueve que las células se hagan más resistentes al estrés oxidativo, aun cuando se expongan a concentraciones superiores de estas sustancias.

Dicho pretratamiento posibilitó a las células de *Y. lipolytica* adaptarse a los agentes oxidantes, permitiendo el incremento de la actividad de la enzima catalasa 3.3 y 4.2 veces cuando las células fueron expuestas a un pretratamiento con H_2O_2 0.3 mM y menadiona 0.05 mM, respectivamente. Los autores concluyeron que la tasa de supervivencia celular durante la fase de crecimiento exponencial, es derivada de la activación de diversos mecanismos de adaptación basados en la actividad de las enzimas antioxidantes como consecuencia de un pretratamiento a bajas concentraciones de agentes oxidantes.

En el trabajo experimental realizado en el Laboratorio de Proteómica en el CINSP por Desentis-Desentis (2015), se analizó la modificación en el patrón de expresión de los genes *SOD*, *CAT* y *GPx* (que codifican para enzimas que participan en la defensa antioxidante) en células de *Y. lipolytica* expuestas a estrés oxidativo con diferentes agentes oxidantes (H_2O_2 , menadiona y ácido gálico). El estudio concluyó que, en función de los tratamientos, dichos genes se expresan de forma diferente, y que el gen que codifica para la enzima catalasa (*CAT3*) fue el que presentó mayores cambios en su expresión, en respuesta al estrés oxidativo. Dicho hallazgo fue confirmado posteriormente en el trabajo de Miranda-Roblero (2016), donde se analizó el efecto que sobre la expresión de estos genes tuvo la exposición al agente oxidante H_2O_2 (a una concentración de 4.5 mM) de células jóvenes (fase exponencial) y envejecidas (fase estacionaria). En dicho trabajo se concluyó que durante tiempos cortos de exposición al agente oxidante (15 min), los genes analizados (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2* y *GPx*) se expresaron más en las células jóvenes que en las envejecidas, de los genes analizados, el gen *CAT3* se sobreexpresó en ambos tipos de células mostrando mayores incrementos en su expresión, en respuesta al estrés oxidativo. Posteriormente en el estudio de Quiñones-González (2018), se construyó una mutante por delección del gen *CAT3* y, para su análisis, las células se sometieron a condiciones de estrés oxidativo (con H_2O_2 , 5 mM) se demostró que fenotípicamente la exposición de dicha concentración de H_2O_2 , modifica el tamaño la cepa mutante *Ylcat3- Δ* (con respecto a la cepa parental). Sin embargo, en ambas condiciones (con y sin estrés oxidativo) tanto el dimorfismo

como el crecimiento celular fueron similares en las cepas mutante y parental. Estos resultados sugieren que otros genes (*CAT1*, *CAT2*, *SOD1*, *SOD2* O *GPX*) estén regulando la respuesta antioxidante, como un mecanismo compensatorio ante la ausencia del gen *CAT3*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

El material biológico que se utilizó para realizar este trabajo está representado por células de las cepas P01a y mutante Ylcat3-Δ de *Y. lipolytica*.

La cepa P01a corresponde a la cepa parental, mientras que la cepa mutante Ylcat3-Δ se generó por delección del gen *CAT3*, utilizando como fondo genético a la cepa P01a (Quiñones-González, 2018).

5.2 Métodos

5.2.1 Diseño del estudio

Estudio de tipo transversal, experimental y analítico, utilizando como modelo de estudio a las cepas parental (P01a) y mutante (Ylcat3-Δ) del hongo dimórfico *Y. lipolytica*. Se evaluó el efecto que tuvo la inducción de estrés oxidativo, en estas células (en fase de crecimiento exponencial) expuestas a 5 mM de H₂O₂ durante 15 minutos, sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y el patrón de expresión de los genes que codifican para las diferentes catalasas (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) de *Y. lipolytica*.

Las técnicas utilizadas para el trabajo experimental se desarrollaron en los laboratorios de Proteómica, Bioquímica Nutricional, Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP), de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

5.2.2 Procedimiento experimental

En la figura 3 se muestra el esquema correspondiente a la estrategia general de trabajo.

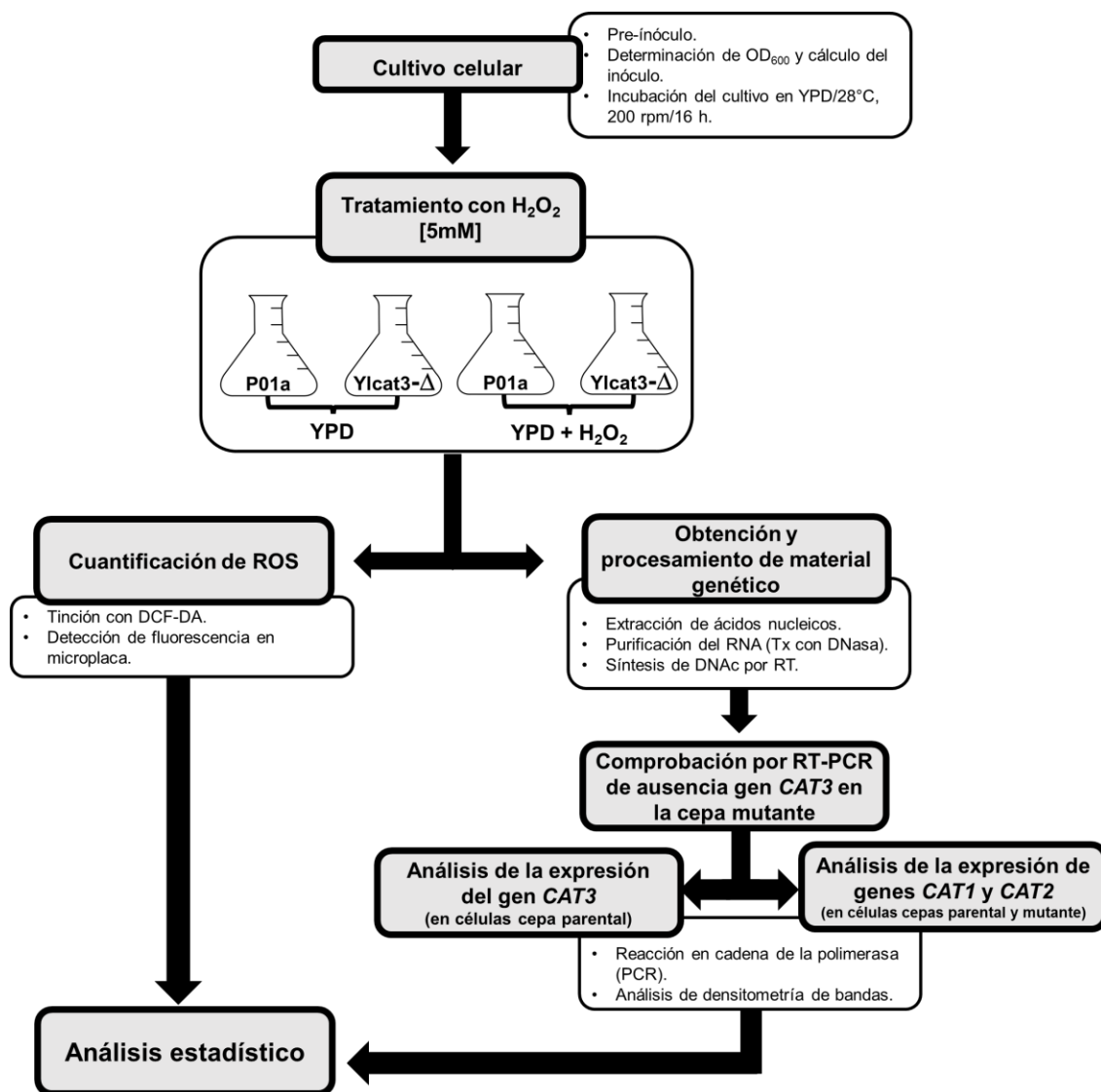


Figura 3. Esquema general de trabajo. OD: densidad óptica; OD₆₀₀: densidad óptica de una longitud de onda de 600nm; YPD: medio de cultivo *Yeast Peptone Dextrose*; °C: grados Celsius; rpm: revoluciones por minuto; h: horas; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; ROS: especies reactivas de oxígeno; mM: concentración milimolar; DCF-DA: fluoróforo diacetato de diclorofluoresceína; RNA: ácido ribonucleico; DNAc: DNA complementario; RT: retrotranscripción.

5.2.2.1 Cultivo celular

5.2.2.1.1 Preparación del medio de cultivo YPD

Se utilizó el medio de cultivo líquido YPD, compuesto por extracto de levadura (1%), peptona de caseína (2 %) y glucosa (2 %) disueltos en agua miliQ estéril. Previo a utilizarse, se esterilizó en autoclave (121 °C y 15 lb/pulg² por 15 min).

5.2.2.1.2 Preparación y ajuste del pre inóculo según la OD

Dentro de una campana de flujo laminar (Modelo: SG 403G, SterilGARD III Advance), se seleccionó una colonia aislada a partir de cultivos en placa (YPD-agar), de las células de *Y. lipolytica* (cepas P01a y Ylcat3-Δ). Las colonias seleccionadas se sembraron en 10 ml de medio YPD líquido contenido en un tubo cónico de 50 ml de capacidad; los cultivos se dispusieron en una incubadora con sistema de agitación (Modelo: IST-3075 / IST-4075R, Lab Companion) a una temperatura de 28 °C a 200 rpm por 16 h.

Para ajustar la cantidad de material biológico a utilizar en los diferentes experimentos se utilizó un espectrofotómetro (Modelo: UV-Visible Evolution 300, Thermo Scientific) para determinar la densidad óptica (OD) de ambas cepas a una longitud de onda de 600 nm. Los inóculos partieron de una OD₆₀₀ inicial de 0.2 en un volumen final de 50 ml de medio YPD líquido, contenidos en un matraz (250 ml). El volumen del pre inóculo se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$V_i = \frac{V_f \times C_f}{C_i}$$

- Vi: cantidad de pre-cultivo que se utilizó a partir del preinóculo.
- Cf: concentración final (OD₆₀₀: 0.2).
- Vf: volumen final.
- Ci: OD₆₀₀ obtenida del pre cultivo.

Los inóculos con OD₆₀₀ ajustada a 0.2 se dispusieron en 4 matraces (250 ml) con 50 ml de medio líquido YPD, rotulados de la siguiente forma:

A: P01a sin H₂O₂

B: Ylcat3-Δ sin H₂O₂

C: P01a + [5 mM] de H₂O₂

D: Ylcat3-Δ + [5 mM] de H₂O₂

Los cultivos, se incubaron a 28 °C, con agitación (200 rpm), durante 16 h (debido a que, en estudios previos de nuestro equipo de trabajo, se demostró mediante análisis de curvas de crecimiento, que la fase de crecimiento exponencial o logarítmica de esta levadura comprende entre las 6 – 24 h (Desentis-Desentis, 2015; Miranda-Roblero, 2016; Sifuentes-Gaspar, 2014).

5.2.2.2 Inducción del estrés oxidativo en los cultivos

La inducción del estrés oxidativo en las células en fase de crecimiento exponencial de las cepas parental y mutante de *Y. lipolytica* se generó a partir de la exposición con el agente oxidante peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 5 mM) incubadas a 28 °C a 200 rpm por 15 min (Miranda-Roblero, 2016; Quiñonez-González, 2018).

5.2.2.3 Detección de especies reactivas de oxígeno

Al concluir el tiempo de exposición al agente oxidante se determinó la OD₆₀₀, de cada uno de los cultivos, como se describe en el apartado 5.2.2.1.2; la OD de cada uno de los cultivos se ajustó a 1.0 en un volumen final de 5 ml utilizando H₂O miliQ estéril para la dilución la cual se mezcló por inversión y pipeteo, para recuperar las células. De esta solución, se colocaron 1.2 ml en 2 tubos Eppendorf (1.5 ml), posteriormente los paquetes celulares se recuperaron por centrifugación (12,000 rpm por 3 min a TA) en una microcentrífuga (Modelo: 5415D, Eppendorf®). Uno de los paquetes celulares obtenidos de cada tratamiento, fue

expuesto a una solución con el fluoróforo diacetato de diclorofluoresceína (Sigma-Aldrich) (DMSO/PBS 1x/DCF-DA [1mM]), mientras que al otro se le administró una solución sin fluoróforo (DMSO/PBS 1x). Posteriormente las células se incubaron a 28 °C por 1 h en la oscuridad. Luego, se obtuvo el paquete celular por centrifugación en las condiciones descritas y las células se lavaron 3 veces con una solución de buffer de fosfato salino (PBS 1x). Las células se resuspendieron con 1.2 ml de buffer PBS 1x; cada una de las muestras se colocó en una placa de 96 pocillos (200 µl de muestra por pocillo), por quintuplicado. Posteriormente se determinó la fluorescencia emitida en cada una de las muestras (465 nm de excitación y 538 nm de emisión) utilizando un fluorímetro (Modelo: Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific). La fluorescencia expresada como unidades relativas de fluorescencia (URF), se determinó al restar el valor de fluorescencia de las células suspendidas en la solución sin el fluoróforo (DMSO/PBS 1x) del valor obtenido en las células tratadas con la solución que contenía el fluoróforo (DMSO/PBS 1x/DCF-DA [1mM]).

5.2.2.4 Obtención y procesamiento del material genético

Para la obtención del material genético de las células correspondientes a las cepas P01a y Ylcat3-Δ con y sin exposición al agente oxidante (H₂O₂ 5mM), los paquetes celulares correspondientes se recuperaron por centrifugación (12,000 rpm por 5 min) a partir de 4.5 ml de los cultivos utilizados para medir la generación de ROS (apartado 5.2.2.3). Los paquetes celulares se obtuvieron manipulando las muestras sobre hielo molido (para evitar la degradación de los ácidos nucleicos) y se almacenaron a -80 °C, hasta el momento de realizar la extracción de los ácidos nucleicos.

5.2.2.4.1 Extracción de ácidos nucleicos

Los polisacáridos (quitina) presentes en la pared celular de las levaduras, generan una resistencia a la lisis celular ante el uso de métodos químicos convencionales, por lo que se incorporó el uso de las perlas de vidrio para su

ruptura mecánica para complementar el método de extracción de ácidos nucleicos con fenol-cloroformo, como describe Hoffman y Winston (1987).

De cada uno de los cultivos de las cepas parental (P01a) y mutante (Ylcat3-Δ) creciendo en fase exponencial (16 h) con y sin exposición al H₂O₂ 5 mM, se colocaron 1.5 ml en un tubo de propileno (1.5 ml) por separado, para posteriormente centrifugarlo a 12,000 rpm por 2 min y decantarlo (este proceso se repitió 2 veces). A cada paquete celular se le añadió 100 µl de perlas de vidrio, 400 µl de buffer de lisis TSNT (compuesto de 10 mM de Tris HCl (pH 8), 100 mM de NaCl, 1 % de SDS, 2 % de Tritón X-100 y 1 mM de EDTA) y 400 µl de fenol-cloroformo (1:1), sometiénolo a 3 ciclos de lisis mecánica con vórtex e incubación en hielo (1 min / 1 min). Las muestras se centrifugaron (12,000 rpm por 10 min) y el sobrenadante obtenido se recuperó, y a partir de éste se obtuvieron los ácidos nucleicos por precipitación (incubándolos con 0.1 V de acetato de sodio al 3 M y 2 V de etanol absoluto frío a – 20 °C por 30 min). Una vez cumplido el tiempo de incubación, los ácidos nucleicos precipitados se recuperaron por centrifugaron (12,000 rpm por 15 min) y se lavaron 2 veces con 500 µl de una solución de etanol al 70 % en agua bidestilada estéril. Posteriormente las muestras se centrifugaron (12,000 rpm por 5 min) y el sobrenadante decantó. Los ácidos nucleicos se secaron a temperatura ambiente durante 10 min y se resuspendieron en 50 µl de agua bidestilada estéril.

La calidad de los ácidos nucleicos obtenidos, se evaluó por electroforesis al colocar las muestras en un gel de agarosa (0.7 %) teñido con bromuro de etidio y su concentración se determinó con un espectrofotómetro (Modelo: Nanodrop 2000 UV-Visible, Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 260 nm.

5.2.2.4.2 Aislamiento del RNA

El aislamiento del RNA de los ácidos nucleicos (mezcla de DNA y RNA), se realizó con el kit Isolate II RNA Mini Kit de la marca BIOLINE® según las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones como se describe a continuación:

La muestra y los reactivos se manipularon sobre hielo molido para realizar este proceso. En un tubo de propileno de 250 μ l, se colocaron 1,000 ng de ácidos nucleicos, 1 μ l de la enzima DNasa I y 1 μ l del Buffer RDN. La reacción se aforó a un volumen de 10 μ l con agua bidestilada estéril. Los reactivos se mezclaron con los ácidos nucleicos por pipeteo suave y la reacción se incubó a 37 °C por 1 h. Al finalizar la incubación, se añadió a la reacción 1 μ l de DNasa I, se mezcló por pipeteo y se volvió a incubar a 37 °C por 1 h. Luego de esta segunda incubación, a la reacción se le añadió 1 μ l de una solución de EDTA [25 mM] y se incubó a 65 °C por 10 min, con el objetivo de inactivar química y térmicamente a la enzima DNasa I. El volumen final de la reacción fue de 12 μ l.

Al finalizar la reacción, se determinó la concentración del RNA con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

5.2.2.4.3 Expresión de genes por RT PCR

La síntesis de DNAc se realizó utilizando como templado de la reacción al RNA aislado y los reactivos del kit GoScript Reverse Transcriptase de la marca Promega®, según las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones como se describe a continuación:

La muestra y los reactivos se manipularon sobre hielo molido para realizar este proceso. En un tubo de propileno de 250 μ l se colocaron 500 ng de RNA y 1 μ l de Oligo DT, aforando a un volumen final de 12 μ l con agua bidestilada estéril. La reacción se mezcló por pipeteo suave y se incubó a 70 °C por 5 min. Al finalizar la incubación, la reacción se colocó sobre hielo molido durante 5 minutos.

En otro tubo de propileno de 250 μ l se preparó un mix con 4 μ l de Buffer, 2 μ l de $MgCl_2$, 1 μ l de DNTPs y 1 μ l de la enzima RT (retrotranscriptasa). Luego de mezclar suavemente por pipeteo, el mix (8 μ l) se transfirió a la reacción del RNA con el Oligo DT, obteniendo un volumen final de 20 μ l.

Esta reacción se incubó primero a 25 °C por 5 min (para favorecer el alineamiento de la cola poli A del RNAm, con la secuencia poli T del Oligo DT), luego a 42 °C

por 1 h (fase de extensión del DNAc) y finalmente a 70 °C por 15 min (para inactivar la RT).

Al finalizar la reacción, se determinó la concentración del DNAc con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

El producto obtenido de la transcripción reversa (DNAc), fue utilizado como templado para la amplificación de los fragmentos de interés mediante el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en punto final.

Para la reacción de PCR se utilizó el kit de reactivos My Taq™ DNA polymerase de la marca Bioline (Buffer MyTaq 5x (5 mM MgCl² y 5 mM DNTPs) y My Taq™DNA polymerase (5 U/μl)), agua bidestilada estéril, oligonucleótidos previamente diseñados por Desentis-Desentis, (2015) y Miranda-Roblero (2016), (ver tabla 2) disponibles en el Laboratorio de Proteómica, CINSP, FaSPyN, UANL, que permitieron la amplificación de los genes de interés en la levadura *Y. lipolytica* utilizados en este trabajo (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3* y *ALG9* como gen constitutivo) y DNAc como templado de la reacción.

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de genes

Gen	Identificación del gen	Secuencia de oligonucleótidos 5' → 3'	Amplicón (pb)	Temp (°C)
ALG9	YALI0E28941g	F: CCGGCGACTTTGCGATACTGTGCC R:CCAGCAACAGCAATGAGCACAAAGCC	535	60
CAT1	YALI0E34265g	F:CCACCACCGTGCGATTTTCTACC R:CATGGTCTGAAGGGAAACGGTCC	539	
CAT2	YALI0E34749g	F:CCATGCAAAGGGAGGAGGAGCC R:CCGTCCACGAGGGGTAATCCC	623	
CAT3*	YALI0F30987g	F:CAAGACCTTCACTCGATTCTCCACC R:CGTCATTGGTGAGGTTCTTGATGCC	425	

F: oligonucleótido *Forward*, R: *oligonucleótido Reverse*; pb: pares de bases; °C: grados Celsius; * Se utilizó para comprobar la delección del gen *CAT3* en la cepa mutante.

El volumen de DNAc requerido para utilizar 1,000 ng de templado en la reacción de PCR se calculó con la formula $V_i C_i = V_f C_f$, a partir de la concentración obtenida de DNAc de cada una de las muestras; posteriormente la reacción se aforó a un volumen final de 12.5 μl con agua bidestilada estéril.

En la tabla 3, se muestran los volúmenes utilizados para cada uno de los reactivos.

Tabla 3. Reactivos utilizados para una reacción de PCR en punto final

Reactivo	Volumen (μl)
Agua bidestilada estéril *	—
Buffer de reacción My Taq (5x)	2.5
DNAc (1000 ng) *	—
Oligonucleótido <i>Forward</i> (10 mM/ μl)	2
Oligonucleótido <i>Reverse</i> (10 mM/ μl)	2
MyTaq™ DNA polymerase (5 U/μl)	0.1
Total	12.5

* Cantidades variables, de acuerdo a concentración obtenida del DNAc.

El número de ciclos necesario para la amplificación de los fragmentos de interés (28 ciclos), por la técnica de PCR, utilizando como templado de la reacción DNAc, se determinó tomando como premisa que, tras comparar los valores intensidad de los productos amplificados de los diferentes genes de interés (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) con el valor constante de un gen constitutivo (*ALG9*), fuera posible comparar el número de copias de RNAm presentes (Peixoto, et al., 2004), y de esta forma conocer el comportamiento que tienen los genes de interés tras someter a las células parental y mutante de *Y. lipolytica* a diferentes condiciones experimentales

5.2.2.4.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2 %. El gel de agarosa fue obtenido de la mezcla de 2 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1x contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad; la agarosa se disolvió con calor, al colocar el matraz sobre una placa de calentamiento (Modelo: pc-420, Corning Stirrer ®); luego de que la agarosa estuviera líquida y transparente, se vaciaron 25 ml a un tubo cónico de 50 ml de capacidad y se le añadió 2 μl del agente intercalante bromuro de etidio (10 mg/mL), se mezcló por inversión y se transfirió en un molde al que se le colocó un peine de plástico para formar los pocillos. El gel de agarosa se solidificó en el molde a TA por 30 min, luego se sumergió en una solución de TAE1x, dentro de

una cámara de electroforesis (Modelo: Mini-Sub®, Sub cell, Ready agarose™) equipada con una fuente de poder (Modelo: Power-Pac 300, BIO RAD®).

Los productos de la reacción de PCR se mezclaron por pipeteo con 2 µl de buffer de carga (azul de bromofenol (0.25 %) y sacarosa (40 %)) y se colocaron por separado en los pocillos del gel con una micropipeta de volumen variable. Las muestras se sometieron a electroforesis aplicando un voltaje inicial de 20 V por 5 min seguido de un voltaje de 90 V por 45 min.

Los productos amplificados de la reacción de PCR correspondiente a los genes de interés (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) se visualizaron y analizaron a través de la determinación del número de píxeles (análisis por densitometría de bandas), utilizando un fotodocumentador equipado con lámpara de luz ultravioleta (Modelo: GelDoc-It Imaging System, UVP). el tamaño de los fragmentos amplificados se corroboró utilizando un marcador de peso molecular 1,500 bp Ladder (Hyperladder IV, BIONLINE).

Los valores de fluorescencia de los productos amplificados podrían ser afectados por las características propias del fotodocumentador, los filtros utilizados, el tiempo de vida de la lámpara entre otros, por lo que la comparación de los valores de expresión realizados entre los diferentes experimentos no es posible (Cornejo-Romero et al., 2014).

Por lo anterior, los valores de expresión de los genes de interés se normalizaron con el valor del amplicón del gen constitutivo *ALG9* que codifica para la enzima alfa 1,2 manosiltransferasa, diseñados por Miranda-Roblero (2016) como se describe a continuación. En cada uno de los geles de agarosa requeridos para el desarrollo de este trabajo, a parte de los amplicones de los genes de interés (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*), se incluyó el producto amplificado del gen constitutivo *ALG9*. El valor del amplicón de *ALG9* (número de píxeles determinado por el fotodocumentador) de uno de los geles, sirvió como referencia para determinar un factor de corrección, utilizando el valor de fluorescencia emitido por los amplicones de *ALG9* de los otros geles. Dicho factor de corrección se aplicó para

determinar los valores normalizados de expresión de los amplicones de los genes de interés, de los diferentes experimentos.

5.2.2.4.5 Análisis de secuencias múltiple y construcción de árbol filogenético

La presencia de isoformas de catalasa se ha descrito en numerosas especies como *S. cerevisiae*, *Debaromyces hansenii* y *Neurospora crassa* (Chary & Natvig, 1989; Nishimoto et al., 2016 & Segal-Kischinevsky et al., 2011). Estas enzimas son codificadas por diferentes genes y cumplen con funciones específicas que dependen principalmente de su ubicación celular (Semchyshyn, 2009).

En la levadura *S. cerevisiae* se han identificado dos isoenzimas catalasas: catalasa A asociada a organelos, que responde ante el estímulo del H₂O₂ (Cta1p) y una catalasa T típica soluble involucrada en la descomposición del H₂O₂ producidos por la enzima acil-CoA oxidasa, durante la beta oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas (Ctt1p). Ambas enzimas son codificadas por dos genes diferentes (*CTA1* y *CTT1*), y están localizadas en diferentes compartimentos: Ctt1p es una enzima citosólica, mientras que Cta1p está ubicada principalmente en los peroxisomas (Petrova et al., 2004, Semchyshyn, 2009; Herrero et al., 2008).

Con el objetivo de tener una mayor comprensión del fenómeno biológico ejercido por la exposición al agente H₂O₂ en las células carentes el gen *CAT3*, así como comparar los resultados de este estudio con lo reportado en diferentes especies de levaduras, se realizó un análisis filogenético. Para determinar la putativa localización celular (citosólica o peroxisomal) de las diferentes catalasas en *Y. lipolytica* (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*)

Se realizó un análisis de secuencias múltiple y la construcción del árbol filogenético utilizando el algoritmo ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) y el software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*)

versión 10.1 con las secuencias nucleotídicas que codifican para la enzima catalasa de otras especies de levaduras.

Las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican para catalasa en las levaduras *S. Cerevisiae*, *P. pastoris*, *C. albicans*, *C. glabrata* y *Y. lipolytica* se obtuvieron en los portales bioinformáticos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=>) y KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>). Los códigos de identificación de las secuencias utilizadas se enlistan en la tabla 4.

Tabla 4. Códigos de identificación de las secuencias utilizadas para el análisis múltiple de secuencias y para la construcción del árbol filogenético.

Código de identificación	Gen	Organismo	Base de datos
NC_001139.9	CTT1	<i>S. cerevisiae</i>	NCBI
NC_001136.10	CTA1		
AB472085.1	CTA1	<i>P. pastoris</i>	
YALI0E34265g	CAT1	<i>Y. lipolytica</i>	KEGG
YALI0E34749g	CAT2		
YALI0F30987g	CAT3		
CAALFM_C106810WA	CAT1	<i>C. albicans</i>	
CAGL0K10868g	CAT	<i>C. glabrata</i>	

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information); KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

5.2.2.5 Comparación de la respuesta celular (generación de ROS y expresión de genes)

El software estadístico SPSS IBM Statistics® versión 22.0 se utilizó para analizar los resultados. Se determinaron las medias y desviaciones estándar (estadística descriptiva) de los valores de generación de ROS y expresión de los genes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*. La normalidad de los datos se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk (puesto que la n de los grupos fue inferior a 50). Los valores de la expresión de los genes por cepas con y sin exposición al H₂O₂, se evaluaron con una t de *Student* para muestras independientes.

A los datos que cumplieron con el supuesto de normalidad, se les realizó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. Los datos que tuvieron las

características requeridas para realizar pruebas paramétricas (normalidad y homogeneidad en varianza) se les aplicó la prueba de Análisis de Varianza de un Factor (ANOVA), seguida de una prueba post hoc Tukey. La prueba no paramétrica Kruskal Wallis se utilizó para comparar los valores que no cumplieron con el supuesto de normalidad.

VI. RESULTADOS

6.1 Cuantificación de la generación de ROS en células de *Y. lipolytica*

En condiciones normales (sin tratamiento) la producción de ROS tanto en la cepa parental como en la mutante produjeron cantidades similares de ROS ($p > 0.05$).

Las células de la cepa parental expuestas al H_2O_2 mostraron una producción significativamente menor de ROS ($p = 0.001$), respecto a las células sin tratamiento (Figura 4). Por el contrario, las células de la cepa mutante sometidas al mismo tratamiento, tuvieron mayor generación de ROS respecto a las células no tratadas. El análisis estadístico indica que las diferencias observadas en la producción de ROS entre las células de la cepa mutante con y sin tratamiento no son significativas ($p > 0.05$).

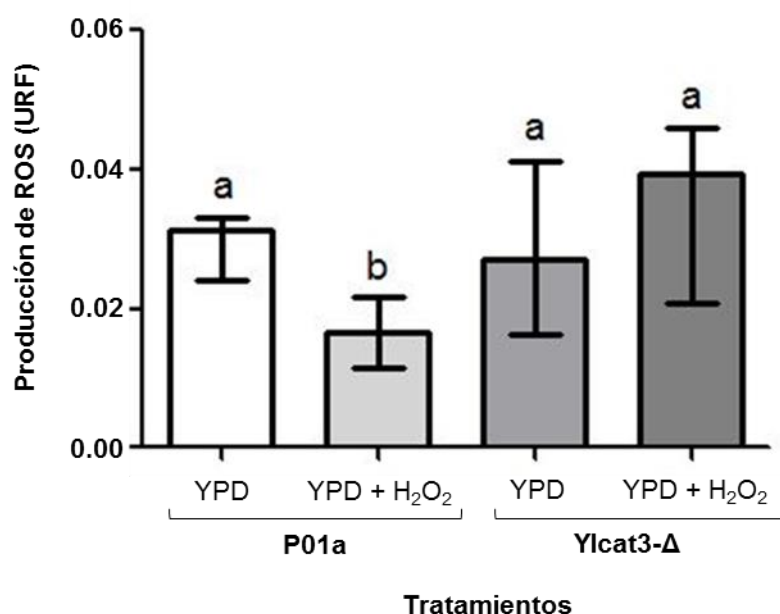


Figura 4. Comparación de la generación de ROS en células de *Y. lipolytica* (parental P01a y mutante *Ylcat3-Δ*) cultivadas en medio YPD con y sin exposición al agente oxidante H_2O_2 . Los valores que se muestran corresponden a las medianas y a los rangos intercuartil (IQR) de 3 experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos comparado mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

6.2 Análisis de la expresión de genes

6.2.1 Extracción de ácidos nucleicos

Posterior a la extracción y cuantificación de los ácidos nucleicos, se realizó una evaluación cualitativa de éstos por medio de electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El volumen de muestra cargado en el gel, se ajustó a 1000 ng de DNA para que todas las muestras mostraran una intensidad similar en las bandas. En la Figura 5 se muestran las bandas correspondientes a los ácidos nucleicos, de las células (parental y mutante) utilizadas en este trabajo. Cualitativamente, la integridad de las bandas (tanto de DNA como de RNA), indicó que los ácidos nucleicos obtenidos tuvieron una calidad adecuada para utilizarse en los procesos experimentales posteriores.

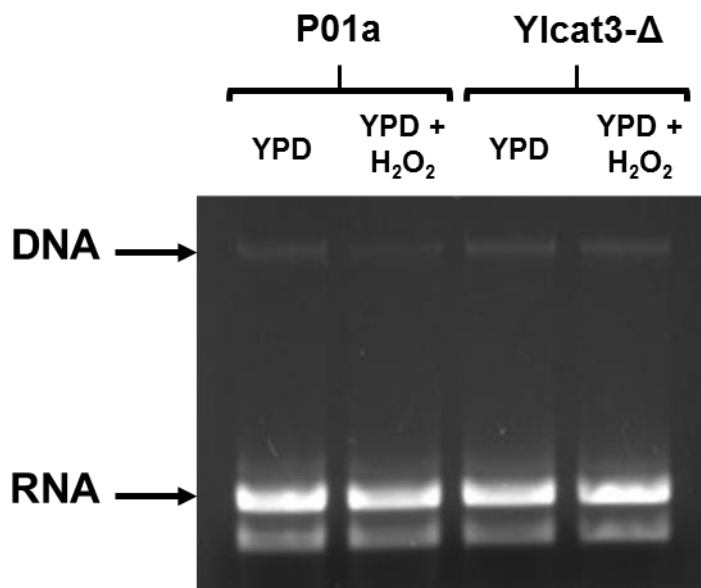


Figura 5. Evaluación cualitativa de los ácidos nucleicos obtenidos de células de *Y. lipolytica*. YPD: *Yeast Peptone Dextrose* (medio de cultivo); H₂O₂: peróxido de hidrógeno; DNA: ácido desoxirribonucleico; RNA: ácido ribonucleico.

6.2.2 Evaluación del tratamiento con DNasa I

La contaminación del DNAg en muestras de DNAc que se analizan por PCR, puede conducir a una sobre estimación de la concentración del RNAm y por lo tanto su amplificación puede interferir con el análisis de expresión de genes (Kuang et al., 2018). Con el objetivo de evaluar si el DNAg se eliminó adecuadamente en las muestras sometidas a tratamiento con la enzima DNasa I, se sometieron a una reacción de PCR con los oligonucleótidos del gen *ALG9*.

En la Figura 6 se muestran los productos amplificados de dichas muestras. En los carriles 2 y 3 se colocaron dos productos de PCR en los que, como templado de dicha reacción, se utilizaron muestras de ácidos nucleicos previamente tratadas con la enzima DNasa I y no se observa producto amplificado. Por otra parte, en el producto de PCR dispuesto en el carril 4 (en el que se utilizó como templado, ácidos nucleicos sin tratamiento con DNasa I) se observa que si se amplificó el fragmento de interés (535 pb). Lo anterior indica que el tratamiento con la enzima DNasa I en las condiciones experimentales utilizadas sobre muestras con ácidos nucleicos totales, eliminó de manera eficiente el DNAg.

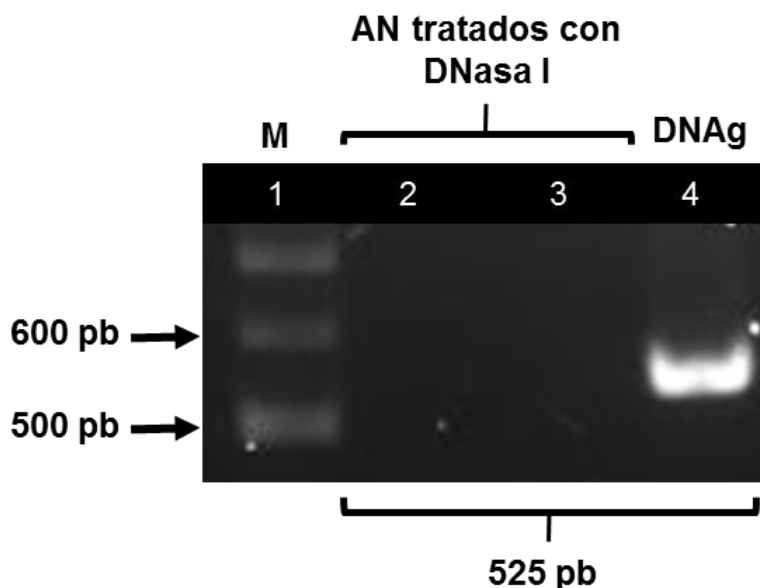


Figura 6. Evaluación de la efectividad del tratamiento con la enzima DNasa. pb: pares de bases; M: marcador de pares de bases 1500 bp Ladder (Hyperladder IV, BIONE); DNAg: DNA genómico. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

6.2.3 Obtención de DNA complementario (DNAC)

Posterior al proceso de retrotranscripción, los DNAC obtenidos se cuantificaron por espectrofotometría, obteniendo concentraciones de alrededor de 700 a 850 ng/μl en cada una de las muestras.

6.2.4 Análisis de expresión de los genes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*

Previo a realizar los análisis de expresión de los genes *CAT1* y *CAT2*, se comprobó la ausencia de transcritos del gen *CAT3* en la cepa mutante utilizando como templado DNAC (Figura 7, panel superior).

Como se esperaba, conforme a lo observado en trabajos previos, en la cepa parental, la expresión del gen *CAT3*, fue mayor en las células tratadas con el agente oxidante con respecto a las no tratadas.

La expresión del gen *CAT1* tanto de la cepa parental como en la mutante, fue mayor en las células cultivadas en condiciones normales (en medio YPD sin exposición al agente oxidante). Por el contrario, la expresión del *CAT2* fue mayor en las células de ambas cepas cuando éstas fueron expuestas al efecto del agente oxidante (H₂O₂), durante 15 minutos.

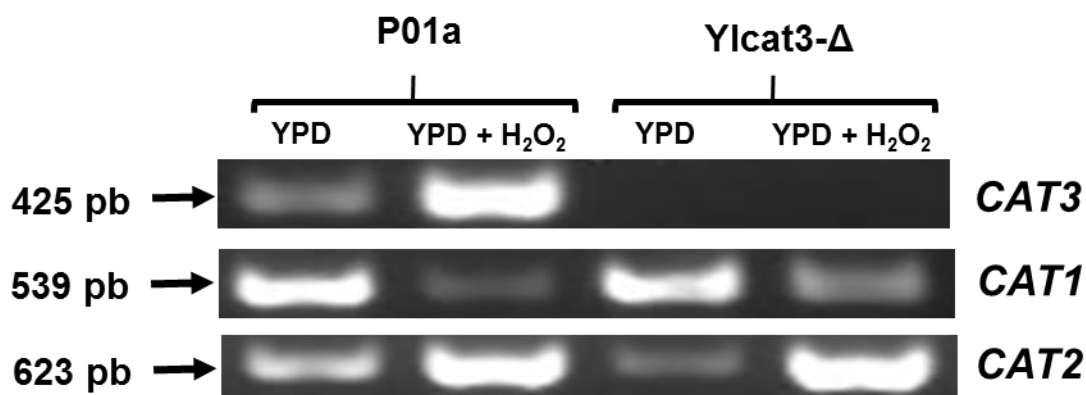


Figura 7. Imagen representativa de los productos de RT-PCR obtenidos para cada gen. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%. P01a: cepa parental de *Y. lipolytica*; Ylcat3-Δ: células de *Y. lipolytica* carentes del gen *CAT3*; YPD: medio de cultivo *Yeast Peptone Dextrose*; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; mM: concentración milimolar.

6.2.4.1 Expresión del gen *CAT3* en células de la cepa parental

La expresión del gen *CAT3* fue mayor ($p = 0.000$) en las células de la cepa parental (P01a) de *Y. lipolytica* expuestas al agente oxidante, en comparación con las células no sometidas al tratamiento con H_2O_2 (Figura 8). Los valores correspondientes al análisis de expresión del gen *CAT3* (obtenidos del análisis de densitometría de los productos amplificados), en las células de la cepa parental P01a de *Y. lipolytica* con y sin exposición al agente oxidante se muestran en la tabla 5.

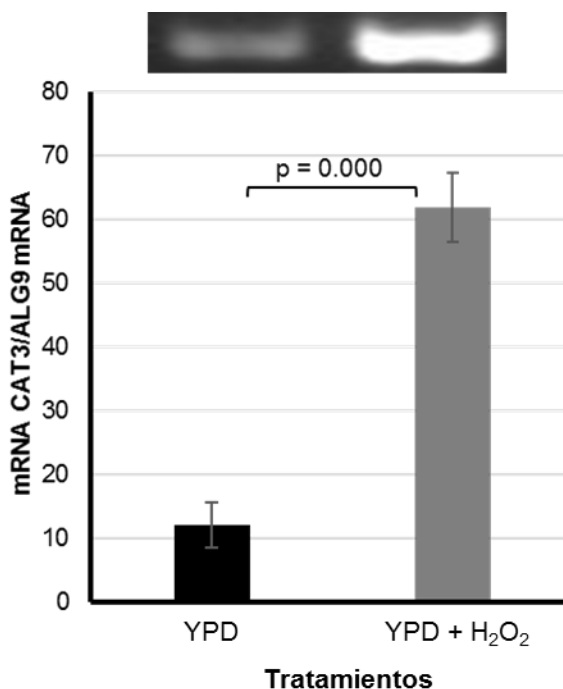


Figura 8. Expresión del gen *CAT3* en la cepa parental (P01a) de *Y. lipolytica* cultivada en medio YPD con y sin exposición al agente oxidante H_2O_2 . Valores expresados en promedio de tres experimentos independientes; la barra de error en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. En la parte superior de la gráfica se muestra una imagen representativa de los productos obtenidos por RT-PCR en cada grupo. El valor de p se determinó mediante la prueba t de *Student* para muestras independientes.

6.2.4.2 Expresión del gen *CAT1*

La expresión del gen *CAT1* en ambas cepas en condiciones de estrés oxidativo fue menor que en las no expuestas. Tras la exposición de las células al agente oxidante H_2O_2 (5 mM), la expresión del gen *CAT1* disminuyó significativamente tanto en la cepa parental ($p = 0.023$) como en la mutante ($p = 0.020$) (Figura 9). La disminución en la expresión del gen *CAT1* en ambas cepas tras ser sometidas al agente oxidante fue similar ($p > 0.05$). Los valores obtenidos del análisis de densitometría de los productos amplificados correspondientes al gen *CAT1*, en los diferentes grupos se muestran en la tabla 5.

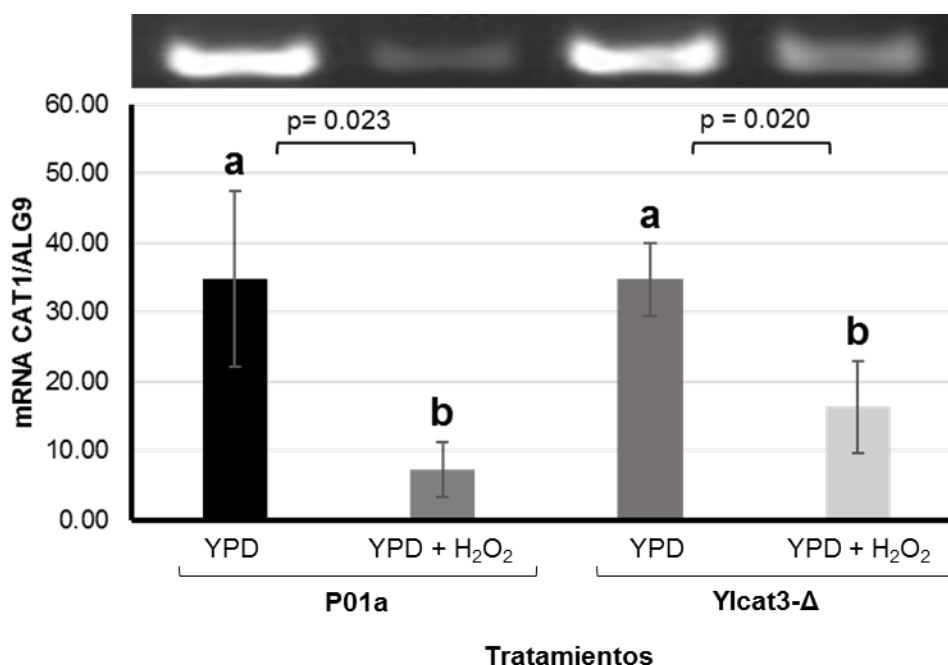


Figura 9. Expresión del gen *CAT1* en cepas parental (P01a) y mutante (Ylcat3- Δ) de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YPD con y sin exposición al agente oxidante H_2O_2 Valores expresados en promedio de tres experimentos independientes; la barra de error en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. En la parte superior de la gráfica se muestra una imagen representativa de los productos obtenidos por RT-PCR en cada grupo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados con la prueba ANOVA y post hoc Tukey ($p < 0.05$). El valor de p se determinó mediante la prueba t de student para muestras independientes.

6.2.4.3 Expresión del gen *CAT2*

En contraste con el patrón de expresión del gen *CAT1*, la expresión del gen *CAT2* fue mayor en las células expuestas al H_2O_2 . Este fenómeno se observó tanto en la cepa parental, como en la cepa mutante.

Cuando las células de ambas cepas fueron expuestas al agente oxidante, se produjo un incremento significativo (con respecto a las células sin tratamiento) en la expresión del gen *CAT2* en las cepas parental ($p=0.001$) y mutante ($p=0.000$), respectivamente (Figura 10). El incremento en la expresión del gen *CAT2* en ambas cepas tras ser sometidas al agente oxidante fue similar ($p > 0.05$).

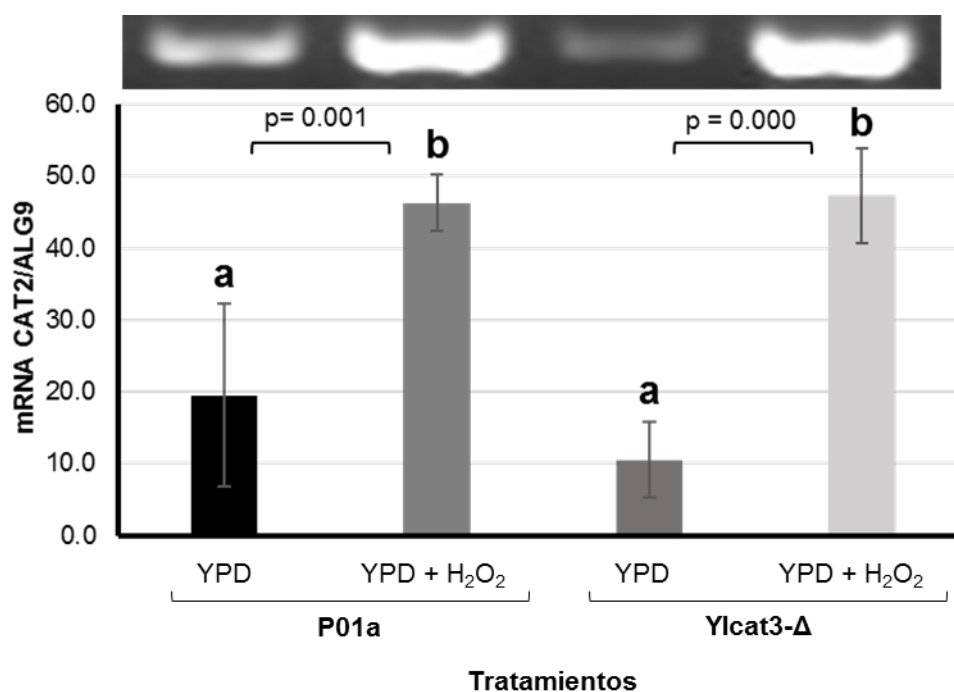


Figura 10. Expresión del gen *CAT2* en cepas parental (P01a) y mutante (Ylcat3- Δ) de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YPD con y sin exposición al agente oxidante H_2O_2 . Valores expresados en promedio de tres experimentos independientes; la barra de error en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. En la parte superior de la gráfica se muestra una imagen representativa de los productos obtenidos por RT-PCR en cada grupo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados con la prueba ANOVA y post hoc Tukey ($p < 0.05$). El valor de p se determinó mediante la prueba t de *Student* para muestras independientes.

Los valores obtenidos del análisis de densitometría de los productos amplificados del gen *CAT2*, en los diferentes grupos se describen en la tabla 5.

6.2.4.4 Patrón de expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* en las células de las cepas parental y mutante de *Y. lipolytica* con y sin inducción al estrés oxidativo

Mientras que la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* fue similar en las células de la cepa parental en las mismas condiciones de cultivo ($p = 0.135$), la expresión del gen *CAT1*, en las células de la cepa la mutante, fue significativamente mayor ($p = 0.010$), en condiciones de cultivo normales (células sin tratamiento con H_2O_2), respecto a la expresión del gen *CAT2* (Figura 11).

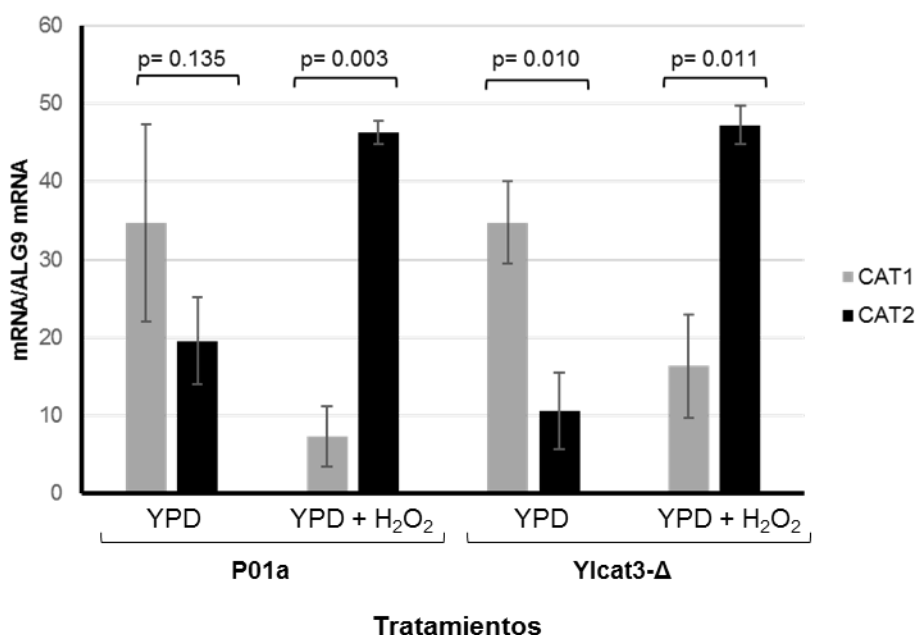


Figura 11. Patrón de expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* en las cepas parental y mutante de *Y. lipolytica* con y sin inducción de estrés oxidativo. Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes; la barra de error en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. El valor de p fue determinado con la prueba t de *Student* para muestras independientes.

En condiciones de estrés oxidativo, la expresión del gen *CAT2* aumenta y es significativamente superior a la expresión del gen *CAT1*, tanto en las células de la cepa parental ($p = 0.003$) como de la mutante ($p = 0.011$); además, se observa una disminución en la expresión del gen *CAT1* en ambas cepas con condiciones

de estrés oxidativo ($p = 0.015$ y $p = 0.039$), respecto a las que crecieron en medios de cultivo normales (sin tratamiento con H_2O_2).

Tabla 5. Valores de expresión de los genes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*.

Cepa		P01a		Ylcat3-Δ	
	Tratamiento	YPD	YPD + H_2O_2	YPD	YPD + H_2O_2
Gen	<i>CAT1</i>	34.7 ± 12.7	7.3 ± 3.9	34.8 ± 5.2	16.3 ± 6.7
	<i>CAT2</i>	19.5 ± 5.6	46.3 ± 1.5	10.5 ± 4.9	47.3 ± 2.5
	<i>CAT3</i>	12.1 ± 3.5	61.9 ± 5.5	-	-

Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los valores de cada uno de los experimentos por gen se ajustaron respecto al valor del gen constitutivo ALG9.

6.2.5 Análisis filogenético de las secuencias de los genes que codifican para catalasas en *Y. lipolytica* y en otras levaduras

El alineamiento de las secuencias de los genes que codifican para las catalasas en levaduras de diferentes especies permitió la construcción del árbol filogenético que se muestra en la figura 12.

En la levadura *S. cerevisiae* se ha descrito que la enzima Cttp1p, codificada por el gen *CTT1*, se encuentra en el citosol (Petrova et al., 2004) y a juzgar por el porcentaje de identidad u homología con las secuencias de los genes *CAT1* y *CAT2* de *Y. lipolytica* (al agruparse en una sola rama del árbol), se infiere que las enzimas codificadas por estos genes se encuentren en el citosol. Por otro lado, el gen *CAT3* de *Y. lipolytica* se agrupó en la rama del árbol filogenético con el gen que codifica para la catalasa peroxisomal *CTA1* en *S. cerevisiae* y *P. pastoris* (Gómez et al., 2019; Semchyshyn, 2009). El gen *CAT3* también se agrupó con la secuencia del gen que codifica para la catalasa en *C. glabrata*, en el que se ha reportado que sólo tiene un gen que codifica para esta enzima (Cuellar-Cruz et

al., 2008), así como con el gen de que codifica para una catalasa ubicada tanto en los peroxisomas como en las mitocondrias de *C. albicans*, (Wysong et al., 1998).

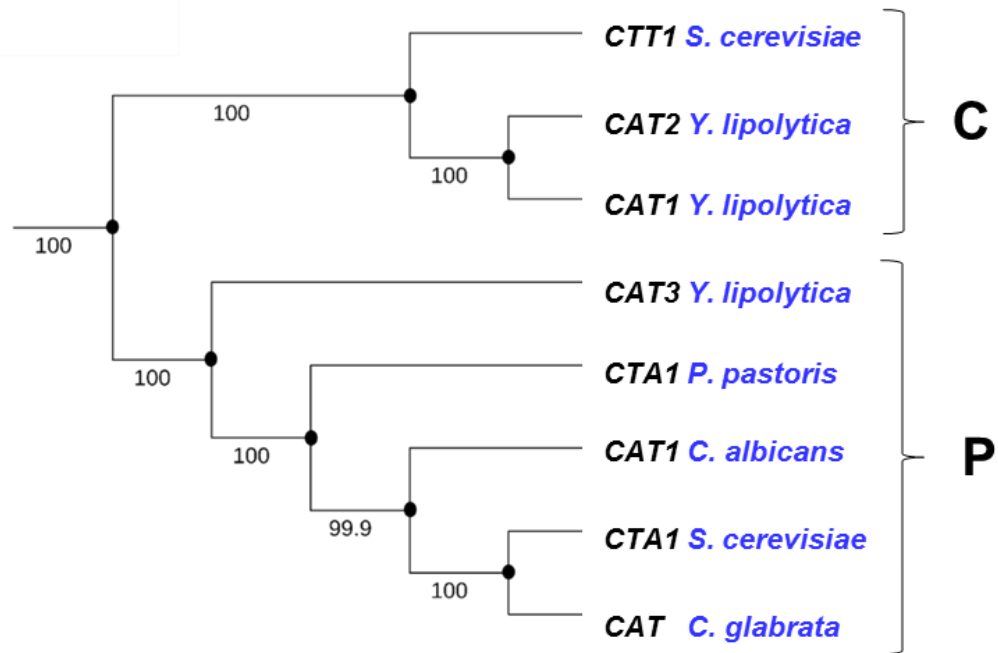


Figura 12. Árbol filogenético construido a partir del alineamiento de secuencias múltiple de genes que codifican para catalasas en levaduras de diferentes especies. *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Y. lipolytica*: *Yarrowia lipolytica*; *P. pastoris*: *Pichia pastoris*; *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*. C: clade catalasas citosólicas; P: clade catalasa peroxisomal. Para la construcción del árbol se utilizó el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA), versión 10.1.

VII. DISCUSIÓN

El oxígeno molecular es utilizado por los organismos aeróbicos para la obtención eficiente de energía, a través de la oxidación de nutrientes (Lopes et al, 2013). La reducción del oxígeno molecular a agua genera moléculas conocidas como ROS. En condiciones fisiológicas, las ROS actúan como señalizadores celulares sobre enzimas, proteínas, factores de transcripción y como segundo mensajero en procesos como el crecimiento, diferenciación, proliferación y apoptosis celular (Madamanchi & Runge, 2005; McKee & McKee, 2015; Patlevic et al., 2016; Perrone et al., 2008). Cuando la concentración de ROS es alta, éstas son capaces de reaccionar con moléculas orgánicas produciendo modificaciones adversas a los componentes de la célula (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos), y ocasionando daños a nivel celular y tisular, relacionados con el desarrollo de diferentes enfermedades.

Las células poseen maquinarias de defensa antioxidante tanto enzimática como no enzimática que contrarrestan el exceso de ROS y protegen los componentes de la célula manteniendo su estado redox en equilibrio (Lopes et al., 2013). Cuando la generación de ROS es superior a la capacidad de defensa antioxidante de las células, se produce estrés oxidativo, condición fisiológica que se caracteriza por la presencia de altas concentraciones de ROS que reaccionan con componentes celulares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos (DNA) y carbohidratos, alterando sus funciones y ocasionando daños a nivel celular y tisular; tales daños conducen al desarrollo de diversas patologías (Barbosa et al., 2008; Birben, et al., 2012; Forman & Torres, 2001; Marroco et al., 2017; Rahman, 2007; Santos-Sánchez et al., 2019; Tan et al., 2018).

Dado que las ROS están involucradas en la etiología de diferentes enfermedades degenerativas en los humanos, los estudios para elucidar los mecanismos del estrés oxidativo se incrementaron recientemente, especialmente utilizando organismos modelo (Pekmez, et al., 2008). Las levaduras que crecen en un ambiente aeróbico, de manera similar a lo que ocurre con otras células eucariotas, continuamente se exponen a diferentes tipos de ROS y a condiciones

no óptimas, relacionadas con el estrés oxidativo (Jiménez-Bremont et al., 2012; Semchyshyn, 2009). Las células de *Y. lipolytica* han sido utilizadas como modelo celular para analizar mecanismos del estrés oxidativo. En estudios previos de nuestro equipo de trabajo se ha observado que, de los diferentes genes que codifican para algunas de las enzimas de defensa antioxidante en *Y. lipolytica* (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2* y *GPx*), el gen *CAT3* presenta una mayor expresión ante la exposición de las células a diferentes agentes oxidantes (Desentis-Desentis, 2015; Miranda-Roblero, 2016). Así mismo, se determinó que tras la delección del gen *CAT3* no se observaron diferencias fenotípicas en el dimorfismo, la morfología y el crecimiento de las células mutantes, con respecto a las células de la cepa parental; resultados que sugieren la posibilidad de que los otros genes que codifican para catalasas (*CAT1* y *CAT2*) tengan una sobreexpresión para compensar la falta de *CAT3* (Quiñones-González, 2018). En este trabajo se analizó el efecto que el estrés oxidativo (generado por la exposición de las células a 5 mM de H_2O_2) tiene sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2*, en células de *Y. lipolytica* tanto de la cepa parental, como de la cepa mutante (carente del gen *CAT3*).

7.1 Generación de especies reactivas de oxígeno en células de *Y. lipolytica*

La actividad de la catalasa es uno de los mecanismos de defensa antioxidante celular más comunes, observada al exponer a las células al efecto de agentes oxidantes como el H_2O_2 (Lopes, Mota, Belo, 2013).

En este trabajo se comparó la producción de ROS entre las células de la cepa parental (tienen el gen *CAT3* y por lo tanto tienen completa su “maquinaria” de defensa antioxidante) y las células de la cepa mutante (carentes del gen *CAT3*) tanto en condiciones normales de cultivo (células cultivadas en medio YPD) como bajo condiciones de estrés oxidativo (inducido por la exposición al H_2O_2 (5 mM) durante 15 minutos). Los niveles de ROS fueron similares en las células correspondientes a las cepas parental y mutante sin exposición al agente oxidante. Sin embargo, cuando ambos tipos de células se sometieron al efecto

del agente oxidante, se observó que en las células mutantes los niveles de ROS, fueron similares a lo observado en estas células sin tratamiento oxidante, mientras que las células de la cepa parental mostraron una mayor respuesta ante la exposición al H_2O_2 , ya que los valores de ROS fueron significativamente menores a los valores generados en estas células en condiciones normales de cultivo (sin inducción al estrés oxidativo).

Con el objetivo de entender este fenómeno biológico, a través de la comparación con resultados de otros estudios en diferentes especies de levaduras, se realizó un análisis filogenético que mostró, que los genes *CAT1* y *CAT2* de *Y. lipolytica* codifican para una putativa catalasa citosólica, mientras que el gen *CAT3*, codifica para una putativa catalasa peroxisomal.

Nishimoto y colaboradores (2016), encontraron que tras la exposición de células de *S. cerevisiae* - carentes de uno o ambos genes que codifican para las catalasas citosólica (*CTT1*) y peroxisomal (*CTA1*)- a diferentes concentraciones de H_2O_2 , la ausencia del gen que codifica para la catalasa peroxisomal *CTA1*, no resultaba letal para la célula, a diferencia de lo observado en las células carentes del gen *CTT1*, así como las células con delección de ambos genes (*CTA1* y *CTT1*). Resultados similares se reportaron en el estudio de Martins y English (2014), quienes describieron la actividad de la enzima citosólica Ctt1 está sobre regulada por la estimulación del H_2O_2 en medio de cultivo YPD rico en nutrientes. Dichos resultados son consistentes con lo reportado en un trabajo previo de nuestro equipo de trabajo, en donde se encontró que la delección del gen *CAT3* en *Y. lipolytica*, no generó células susceptibles al estrés oxidativo (Quiñones-González, 2018). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que, aunque las células carentes del gen *CAT3* expuestas a estrés oxidativo no ejercieran una respuesta de defensa antioxidante en la generación de ROS (similar lo observado en las células de la cepa parental), los niveles de ROS se mantuvieron similares a los determinados en las células mutantes no expuestas al estrés oxidativo ejercido por la exposición al peróxido.

Lo anterior podría explicarse por la forma en cómo se regula la expresión de estos genes, mientras que *CTT1* se estimula por el H₂O₂ exógeno, el gen *CTA1* es regulado principalmente por productos del metabolismo de ácidos grasos (Semchyshyn, 2009). En otra serie de estudios, Izawa y colaboradores (1996), reportaron que la ubicación celular de la catalasa (en los peroxisomas o en el citosol) tiene un ligero o nulo efecto en la susceptibilidad al H₂O₂, y que tanto la catalasa A (codificada por el gen *CTA1*) como la catalasa T (codificada por el gen *CTT1*) tienen la capacidad de ejercer una acción compensatoria en respuesta a la ausencia de una de ellas, para defender a las células de esta levadura contra el estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Un fenómeno similar a lo descrito en las células de *S. cerevisiae* podría explicar, porqué en las células de *Y. lipolytica*, la cepa parental que cuenta con los tres genes que codifican para la enzima catalasa, tenga una respuesta antioxidante más efectiva contra la generación de especies reactivas de oxígeno, a comparación de lo observado en las células mutantes carentes del gen *CAT3*.

En este trabajo, se observó que las células de *Y. lipolytica* de la cepa parental expuestas al agente oxidante mostraron una mayor respuesta antioxidante ante la exposición al H₂O₂, a juzgar por los niveles más bajos de ROS que se encontraron; a diferencia de esto, en las células mutantes carentes del gen *CAT3* no se produjo una respuesta contra la generación de ROS ante la exposición al H₂O₂. Esto podría explicarse considerando las observaciones hechas por Izawa y colaboradores (1996), quienes mencionan que las catalasas podrían no ser tan importantes en condiciones fisiológicas normales, sin embargo, se vuelven necesarias en casos de “emergencia” o de necesidades adaptativas a la tolerancia al estrés oxidativo.

7.2 Expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* en células de *Y. lipolytica*

La adaptación al estrés es de suma importancia para la supervivencia celular, siendo la reorganización coordinada de la expresión de los genes uno de los mecanismos más importantes bajo condiciones de estrés oxidativo (Semchyshyn, 2009). Se ha descrito que la exposición a concentraciones no

letales de H_2O_2 promueve una respuesta celular rápida mediante la inducción de la expresión génica y la traducción de enzimas antioxidantes no activas, que se activan cuando la condición de estrés disminuye, proporcionando a las células la capacidad de adaptarse rápidamente y sobrevivir ante una exposición posterior a concentraciones mayores de dicho agente (Liu et al., 2012; Martins & English, 2014; Semchyshyn, 2009).

Una de las respuestas a las alteraciones redox celulares, derivada de la exposición con agentes oxidantes, es la activación de la catalasa (Lopes et al., 2013). La catalasa es una enzima presente entre organismos aerobios, debido a que cataliza la transformación de $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ a partir del H_2O_2 , producido inevitablemente durante la respiración mitocondrial (Nakagawa et al., 2003). En levaduras, la inducción de la transcripción del gen que codifica para catalasa derivada de estrés oxidativo está mediada por secuencias de regulación específicas denominadas elementos de respuesta al estrés, y la regulación de esta transcripción está dada por mecanismos dependientes e independientes de AMPc (Biryukova et al., 2006).

Contrariamente a lo planteado en la hipótesis de este estudio, la delección del gen *CAT3* en células de *Y. lipolytica*, no modificó la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2* en las células sometidas a condiciones de estrés oxidativo. Una posible explicación a este fenómeno, es que el estudio se realizó en células de *Y. lipolytica* (parental y mutante) en fase de crecimiento exponencial. Se ha descrito que las células en esta fase de crecimiento son más susceptibles al efecto de agentes estresores, al ser metabólicamente más activas que las células en fase de crecimiento estacionario (Lopes et al., 2013). Se ha reportado que los productos del metabolismo de la glucosa (en nuestro estudio, presente en el medio de cultivo YPD), actúan como represores de la actividad de las catalasas. En organismos como *C. albicans*, las células mostraron una mayor actividad de las catalasas incluso sin la exposición al H_2O_2 , cuando éstas fueron cultivadas utilizando como fuentes de carbono glicerol, galactosa y etanol, con respecto a las células cultivadas en presencia de glucosa (Nakagawa et al., 1999). Los autores

mencionan que a medida que la glucosa del medio de cultivo se va agotando (por el uso de las células en fase de crecimiento exponencial) la actividad de las catalasas aumenta.

En otro estudio, Nishimoto y colaboradores (2016) obtuvieron resultados diferentes a los encontrados en este estudio, ya que en las células mutantes de *S. cerevisiae* con ausencia del gen que codifica para la catalasa A peroxisomal (*CTA1*), se produjo un incremento en la expresión del gen que codifica para la catalasa T citosólica (*CTT1*), sugiriendo un mecanismo compensatorio del gen *CTT1*, ante la falta de *CTA1*. Por otra parte, en las células con delección del gen *CTT1* no se observó este efecto, debido a que la exposición al H_2O_2 , incrementó la letalidad de las células. Izawa y colaboradores (1996) también demostraron que la localización de la catalasa en la célula (en el citosol o en los peroxisomas), aparentemente no tiene efectos en la susceptibilidad al H_2O_2 , y tanto la catalasa citosólica como la peroxisomal, podrían ser capaces de compensar la ausencia de una de éstas, para defender a las células de levadura contra el estrés oxidativo.

En 2014, Martins y English demostraron que la actividad del gen *CTT1* de *S. cerevisiae*, que codifica para la catalasa citosólica, es muy importante al momento de proteger a las levaduras ante la presencia de H_2O_2 exógeno en medio rico YPD. En el presente estudio, se observó que la expresión de los genes que codifican para la putativa catalasa citosólica en las células mutantes de *Y. lipolytica* (genes *CAT1* y *CAT2*), es similar a los valores de expresión observados en la cepa parental lo que podría explicar los resultados de un estudio previo de nuestro equipo de trabajo, en el que las células de *Y. lipolytica* carentes del gen *CAT3*, no presentaron cambios en el dimorfismo y el crecimiento celular luego de exponerlas a estrés oxidativo (Quiñones-González, 2018). Además, se ha documentado que las catalasas no son las únicas enzimas responsables e combatir el estrés oxidativo, sino que funcionan en conjunto con otros constituyentes de los sistemas de defensa antioxidante como parte de una respuesta robusta y múltiple frente al estrés oxidativo (Giles et al., 2006). La

regulación de la expresión de genes ante condiciones de estrés oxidativo en las levaduras, es más complejo que lo que se ha observado en organismos procariotas, ya que se ha descrito que se requiere de la expresión de al menos 450 genes para mantener la resistencia celular a las ROS (Folch-Mallol et al., 2004; Perrone et al., 2008). En apoyo a lo anterior, es importante mencionar que en el genoma de *Y. lipolytica* se han identificado, además de los 3 genes que codifican para catalasas (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*), otra serie de genes que forman parte de esta respuesta antioxidante: 2 genes que codifican para superóxido dismutasas (*SOD1* y *SOD2*) y un gen que codifica para la enzima glutatión peroxidasa (gen *GPx*); y se ha demostrado que cada uno de estos genes es transcripcionalmente activo (Desentis-Desntis, 2015; Miranda-Roblero, 2016).

7.3 Análisis de las secuencias que codifican para catalasa en *Y. lipolytica* y otras levaduras

Los hongos deben hacer frente a cambios rápidos y abruptos del medio externo, que van desde la abundancia y escasez de nutrientes, altas y bajas temperaturas, luz intensa entre otras, que pueden generar estrés oxidativo, por lo tanto, la mayoría de los hongos tienen varias catalasas y enzimas que eliminan el H_2O_2 (Hansberg et al., 2012).

Se ha descrito que en algunos organismos la enzima catalasa es codificada por un solo gen: *Homo sapiens* (*CAT*), *Candida glabrata* (*CTA1*) y *Schizosaccharomyces pombe* (*CTT1*) (De-las-Peñas et al., 2015; Forsberg et al., 2001; Paulo, et al., 2014); en otros, por dos genes: *Saccharomyces cerevisiae* (*CTT1* y *CTA1*) y *Debaryomyces hansenii* (*DhCTA1* y *DhCTT1*) (Nishimoto et al., 2016; Segal-Kischinevsky et al., 2011); y en otros por tres genes: *Neurospora crassa* (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) y *Y. lipolytica* (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) (Chary & Natvig, 1989; Desentis-Desentis, 2015; Quiñonez-González, 2018).

La filogenética molecular utiliza datos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas para inferir las relaciones tanto para los organismos como para los genes que mantienen (Ziemert & Jensen, 2012). La filogenética es el estudio de la relación evolutiva entre grupos de organismos (Ziemert & Jensen, 2012).

El desarrollo de técnicas modernas de secuenciación de DNA y proteínas, permitieron la acumulación acelerada de datos de secuencias moleculares (Sleator et al., 2008). La alineación simultánea de muchas secuencias de nucleótidos o aminoácidos es ahora una de las tareas más comunes de la bioinformática (Higgins et al., 1996). Dicho alineamiento sirve como inicio para el análisis filogenético de secuencias, la predicción de estructuras (de DNA o proteínas), el análisis de homología entre genes recién secuenciados y familias de secuencias existentes, la demostración de homología en familias multigénicas, entre otras.

Los árboles filogenéticos son comúnmente utilizados para representar los resultados de muchos análisis bioinformáticos (Huerta-Cepas et al., 2010). Estos árboles filogenéticos son diagramas que representan las relaciones evolutivas entre diferentes taxones (Choudhury, 2014).

Con respecto a las catalasas, un análisis filogenético previo, señaló que las catalasas presentes en los tres principales grupos de hongos (*Basidiomycetes*, *Eucomycetes* y *Hemiascomycetes*) se agrupan en 4 *clades* (ramas del árbol filogenético): las catalasas peroxisomales, las citosólicas, las específicas de esporas y las secretadas (Giles et al., 2006). Mientras que la presencia de catalasas peroxisomales, citosólicas y específicas de esporas, han sido identificadas en hongos pertenecientes en las familias de *Basidiomycetes* y *Eucomycetes*, además de catalasas secretadas en esta última familia, la presencia de las catalasas peroxisomal y citosólica han sido identificadas en hongos como *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Aphis gossypii*, *Candida albicans* y levaduras del género *Yarrowia* (Lachance, 2006) que pertenecen al grupo de los *Hemiascomycetes*.

En *S. cerevisiae* se han identificado dos formas de la enzima catalasa, cada una codificada por un gen respectivo (De-la-Torre-Ruiz et al., 2015). Mientras que la enzima citosólica T, codificada por el gen *CTT1* se estimula por el H₂O₂, la enzima peroxisomal A, codificada por el gen *CTA1* es regulada por el metabolismo de los ácidos grasos (Semchyshyn, 2009).

En organismos como *Cryptococcus neoformans*, la evaluación de la relación filogenética, permitió hipotetizar la función de cuatro de los genes (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3* y *CAT4*) que codifican para enzima catalasa (Giles et al., 2006).

Tomando como referencia lo anterior, en este estudio se realizó un análisis filogenético con las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para catalasa en *Y. lipolytica*. Los resultados se compararon con lo reportado en la levadura *S. cerevisiae* (que ya se ha caracterizado la ubicación celular de las dos enzimas que posee) y en otras levaduras que presentan un patrón similar en al observado en *Y. lipolytica*, en la actividad de la catalasa tras la exposición de las células a condiciones de estrés oxidativo.

Las agrupaciones en las ramas del árbol filogenético, indicaron que los genes *CAT1* y *CAT2*, en *Y. lipolytica* codifican putativamente para catalasas citosólicas, considerando su estrecha similitud con el gen *CTT1* de *S. cerevisiae*. Por otra parte, el gen *CAT3* se agrupó en la rama donde se ubicó el gen *CTA1* (catalasa peroxisomal) de *S. cerevisiae*. Esto resultados son consistentes con lo descrito por Giles y colaboradores (2006), y con lo reportado por Quiñones-González (2018), en donde se determinó que la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *CAT3* de *Y. lipolytica*, presentó una homología del 65 – 73 % con catalasas (particularmente peroxisomales) en otras especies de levadura como *S. cerevisiae* y *S. lignohabitans*, respectivamente.

En el presente trabajo se demostró que la ausencia del gen que putativamente codifica para una catalasa peroxisomal (*CAT3*) en células de *Y. lipolytica*, no modificó el patrón de expresión de los otros genes que putativamente codifican a catalasas citosólicas (*CAT1* y *CAT2*). Mientras que algunos autores refieren que en levaduras como *S. cerevisiae*, la regulación en la expresión de los genes que codifican para las catalasas es diferente de acuerdo a su ubicación celular (Semchyshyn, 2009), otros mencionan que ambos genes tienen la capacidad para compensar la ausencia de uno de ellos (Izawa et al., 1996). En este trabajo, no se encontraron diferencias en la producción de ROS entre las células de la cepa parental y mutante en condiciones de cultivo normales, posiblemente por

un mecanismo similar al reportado en otras especies de levaduras, donde explican que la actividad de las catalasas parece ser más necesaria en situaciones de “emergencia” para defender a la célula de agentes oxidantes que propicien condiciones de estrés oxidativo, que en condiciones fisiológicas. Lo anterior sustenta la respuesta más eficiente de defensa antioxidante que mostraron las células de la cepa parental expuestas al agente oxidante, debido a que al tener su “maquinaria” de defensa antioxidante completa, generaron menores cantidades de ROS con respecto al producido por las células de la cepa mutante. Además, aunque la expresión de los genes *CAT1* y *CAT2*, es similar entre las cepas y los tratamientos, cuando las células de la cepa parental se expusieron al H_2O_2 , la expresión del gen *CAT3* aumentó. Las catalasas combaten el estrés oxidativo en conjunto con otros sistemas de defensa antioxidante como parte de una respuesta robusta y múltiple al estrés oxidativo (Giles et al., 2006). Además de los genes que codifican para las catalasas, en *Y. lipolytica* existen otros genes que codifican a enzimas de defensa antioxidante, como las superóxido dismutasas y la glutathione peroxidasa (Desentis-Desentis, 2015; Miranda-Roblero, 2016), que pudieran estar respondiendo en conjunto con las catalasas presentes en las células de la cepa mutante (*CAT1* y *CAT2*), debido que en las células de la cepa parental ya se ha demostrado que cada uno de los genes que codifican para dichas enzimas son transcripcionalmente activos, ya que la ausencia el gen *CAT3* en estas células, no produjo cambios en características fenotípicas de la levadura como el crecimiento y la morfología (Quiñones-González, 2018).

VIII. CONCLUSIÓN

- La generación de ROS en las células que no se sometieron al efecto del agente oxidante (H_2O_2 5mM), fue similar tanto en la cepa parental P01a como en la mutante Ylcat3- Δ .
- Bajo condiciones de estrés oxidativo, la cepa parental mostró una mayor respuesta antioxidante que se tradujo en una menor generación de ROS, con respecto a la cepa mutante.
- En la cepa mutante (carente del gen *CAT3*) la producción de ROS fue similar en las células que fueron expuestas o no al efecto del agente oxidante (5 mM de H_2O_2).
- Bajo condiciones de estrés oxidativo, el gen *CAT2* se sobre expresa en ambos tipos de células.
- En las células carentes del gen *CAT3* en condiciones de cultivo normales, se muestra una mayor expresión del gen *CAT1*.
- La delección del gen *CAT3* en células de *Y. lipolytica* no indujo cambios en los niveles de expresión de los genes *CAT1* y *CAT2*, en células sometidas a condiciones de estrés oxidativo.
- El gen *CAT3* putativamente codifica para una catalasa peroxisomal.
- Los genes *CAT1* y *CAT2* putativamente codifican para catalasas citosólicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akın, M., Ayoglu, H., Okyay, D., Ayoglu, F., Gür, A., Can, M., Yurtlu, S., Hanci, V., Küçükosman, G., & Turan, I. (2015). Efectos del mantenimiento de varias anestесias sobre los niveles séricos de selenio, cobre, cinc y hierro y la capacidad antioxidante. *Brazilian Journal of Anesthesiology (Edición en Español)*, 65 (1), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.bjanes.2014.04.001>
2. Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., & Rovira, C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 131 (33), 11751–11761. <https://doi.org/10.1021/ja9018572>
3. Amir-Aslani, B., & Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life sciences*, 146, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.014>
4. Arinbasarova, A.Y., Biryukova, E.N., & Medentsev, A.G. (2015). Antistress systems of the yeast *Yarrowia lipolytica* (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51 (2), 122–131. <https://doi.org/10.7868/s0555109915020026>
5. Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress- A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 24 (5), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>

6. Aung-Htut, M.T., Ayer, A., Breitenbach, M., & Dawes, I.W. (2012). Oxidative Stresses and Ageing. New York: Springer.

7. Ayala, A., Muñoz, M.F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4 hidroxy 2 nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1 – 32. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>

8. Barbosa, K.B.F., Bressan, J., Zulet, M.A., & Martínez, J.A. (2008). Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31 (3), 259-280.

9. Barth, G., & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19 (4), 219-237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>

10. Bartosz, G. (2005). Superoxide Dismutases and Catalase. In T. Grune (Ed.), *Reactions, Processes* (Vol. 20, pp. 109-149): Springer Berlin Heidelberg.

11. Beltrán-García, M.J., Ogura-Fujii, T., Manzo-Sánchez, G., & Arias-Castro, C. (2006). Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas?. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 50–58. ISSN:0185-3309

12. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5 (1): 9 – 19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

13. Biryukova, E.N., Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., & Akimenko, V.K. (2006). Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress. *Microbiology*, 75, 243–247. <https://doi.org/10.1134/S0026261706030015>
14. Biswas, S.K. (2016). Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>
15. Bonola-Gallardo, I.F., Irigoyen-Camacho, M.E., Vera-Robles, L.I., Campero-Celis, A., & Hamdan-Partida, A. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias Clínicas*, 15 (1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.cc.2015.06.002>
16. Breitenbach, M., Ralser, M., Perrone, G.G., Iglseider, B., Rinnerthaler, M., & Dawes, I.W. (2013). Oxidative stress and neurodegeneration: the yeast model system. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 18, 1174–1193. <https://doi.org/10.2741/4171>
17. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., & Krause, K.H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
18. Briones-Martin-Del-Campo, M., Orta-Zavalza, E., Juárez-Cepeda, J., Gutierrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Castraño, I., & De-Las-Peñas, A. (2014). The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31 (1), 67 – 71. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.012>

19. Cabrales-Arellano, C.P. (2012). Expresión de una proteína CRY1 de *Bacillus thuringiensis* en la levadura *Yarrowia lipolytica* (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. Reynosa, Tamaulipas.
20. Céspedes-Miranda, E., & Castillo-Herrera, J. (2008). La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso ¿realidad o mito?. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 27 (2).
21. Chang, Y.C., & Chuang, L.M. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *American Journal of Translational Research*, 2 (3), 316-331.
22. Chary, P., & Natvig, D.O. (1989). Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock and development, *Journal of Bacteriology*, 171 (5), 2646 – 2652. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2646-2652.1989>
23. Choudhury, S. (2014). Bioinformatics for beginners, genes, genomes, molecular evolution, databases and analytical tools, (1a ed) Elsevier Inc.
24. Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B., & Rocha-Munive, M.G. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, (1ª ed). SEMARNAT-INECC-UAM-I.
25. Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2008). High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is

controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryotic cell*, 7 (5), 814–825. <https://doi.org/10.1128/EC.00011-08>

26. De-las-Peñas, A., Juárez-Cepeda, J., López-Fuentes, E., Briones-Martín-del-Campo, M., Gutiérrez-Escobedo, G., & Castaño, I. (2015). Local and regional chromatin silencing in *Candida glabrata*: consequences for adhesion and the response to stress. *FEMS Yeast Research*, 15 (6), 1-9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov056>
27. De-la-Torre-Ruiz, M.A., Pujol, N., & Sundaran, V. (2015). Coping with oxidative stress. The Yeast model. *Current Drug Targets*, 16 (1), 2–12. <https://doi.org/10.2174/1389450115666141020160105>
28. Desentis-Desentis, M.F. (2015). Expresión de genes que codifican para enzimas de la respuesta antioxidante de *Yarrowia lipolytica*, condiciones de estrés oxidativo (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL.
29. Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. *Revista de Educación Bioquímica*, 22 (2), 76–84.
30. Dludla, P.V., Nkambule, B.B., Jack, B., Mkandla, Z., Mutize, T., Silvestri, S., Okumarrlando, P., Tiano, L., Louw, J., & Mazibuko-Mbeje, S.E. (2018). Inflammation and oxidative stress in an obese state and the protective effects of gallic acid. *Nutrients*, 11 (1). <https://doi.org/10.3390/nu11010023>
31. Enserink, J.M. (2012). Chemical genetics: budding yeast as a platform for drug discovery and mapping of genetic pathways. *Molecules*, 17 (8), 9258-9273. <https://doi.org/10.3390/molecules17089258>

32. Estrada-Carrasco, C.E., Flores-Terrazas, J.E., Floriano-Sánchez, E., Castro-Marín, M., López-Silvestre, J.L., Campos-Salcedo, J.G., Zapata-Villalba, M.A., Mendoza-Álvarez, L.A., & Cárdenas-Rodríguez, N. (2010). Regulación de enzimas antioxidantes como marcadores tumorales de la próstata. *Revista Mexicana de Urología*, 70 (3), 157–163.
33. Farrugia, G., & Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology*, 2 (64). <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00064>
34. Fickers P., Marty A., & Nicaud J.M. (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29 (6), 632-644. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>
35. Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Covarrubias-Robles, A.A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46 (1 – 2), 24 – 46.
36. Forman, H.J., & Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine*, 22 (4–5), 189 - 216. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(01\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(01)00010-3)
37. Forsberg, L., Lyrenäs, L., Morgenstern, R., & de-Faire, U. (2001). A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase

- levels. *Free Radical Biology and Medicine*, 30 (5), 500–505.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00487-1)
38. Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., & Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822 (9), 1363 – 1373.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.001>
39. Franssens, V., Bynens, T., Van-den-Brande, J., Vandermeeren, K., Verduyckt, M., & Winderickx, J. (2013). The benefits of humanized yeast models to study parkinson's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/760629>
40. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114 (2), 1752 - 1761. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>
41. Giles, S.S., Stajich, J.E., Nichols, C., Gerrald, Q.D., Alspaugh, J.A., Dietrich, F., & Perfect, J.R. (2006). The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryotic Cell*, 5 (9), 1447 – 1459. <https://doi.org/10.1128/EC.00098-06>
42. Gómez, S., Navas-Yuste, S., Payne, A.M., Rivera, W., López-Esteva, M., Brangbour, C., Fullá, D., Juanhuix, J., Fernández, F.J., & Vega, M.C. (2019). Peroxisomal catalases from the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis* as models for oxidative damage in higher eukaryotes, *Free Radical Biology and Medicine*, 141, 279 – 290.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.025>

43. González-Gil, A., González-Madariaga, Y., Heredia-Ruiz, D., Fernández-Caraballo, D., & Ballesteros-Hernández, M. (2013). Enzimas antioxidantes en la hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas Wistar. *Revista Médica Electrónica*, 35 (2) 95–104. ISSN:1684-1824
44. González-Torres, M.C., Betancourt-Rule, M., & Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25 (1), 3–9.
45. Hansberg, W., Salas-Lizana, R., & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525 (2); 170 – 180. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.014>
46. Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780 (11), 1217-1235. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>
47. Higgins, D.G., Thompson, J.D., & Gibson, T.J. (1996). Using Clustal for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology*, 266, 383 – 402. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)66024-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)66024-8)
48. Hoffman, C.S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57 (2 – 3), 267-272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
49. Huerta-Cepas, J., Dopazo, J., & Gabaldón, T. (2010). ETE: a python environment for tree exploration. *BMC Bioinformatics*, 11 (24), 1 – 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-24>

50. Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptative response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320; 61 – 67. <https://doi.org/10.1042/bj3200061>
51. Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14 (16), 1511–1527. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S)
52. Jiménez-Bremont, J.F., Rodríguez-Hernández, A.A., & Rodríguez-Kessler, M. (2012). Development and dimorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica*. en *dimorphic fungi: their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis* (pp. 58-66). Bentham Science Publishers Ltd.. <https://doi.org/10.2174/978160805364311201010058>
53. Kaila, B., & Raman, M. (2008). Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22 (1), 61 – 68. <https://doi.org/10.1155/2008/609039>
54. Kawahito, S., Kitahata, H., & Oshita, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology*, 15 (33) ,4137 – 4142. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.4137>
55. Kerscher, S., Durstewitz, G., Casaregola, S., Gaillardin, C., & Brandt, U. (2001). The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comparative and Functional Genomics*, 2 (2). 80 – 90. <https://doi.org/10.1002/cfg.72>

56. Kirkman, H.N., & Gaetani, G.F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32 (1), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>

57. Kuang, J., Yan, X., Genders, A.J., Granata, C., & Bishop, D.J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *Plos One*, 13 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>

58. Kumar, S., & Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–16. 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

59. Kumari, S., Badana, A.K., Mohan, M., Shailender, G., & Malla, R. (2018). Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomark Insights*, 13. <https://doi.org/10.1177/1177271918755391>

60. Kurtzman, C.P., Fell, J.W., & Boekhout, T. (2011). Chapter 1. Definition, classification and nomenclature of the Yeasts. *The Yeasts* (5 ed) (pp. 3-5). London: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00001-X>

61. Lachance, M.A. (2006). Yeast biodiversity: how many and how much In: Péter G., Rosa C. (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_1.

62. Lazo-de-la-Vega-Monroy M.L., & Fernández-Mejía, C. (2012). Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/51788>

63. León-Pedroza, J.I., González-Tapia, L.A., del-Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G., & González-Chávez, A. (2015). Low grade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: from the molecular evidence to the clinical practice. *Cirugía y Cirujanos*, 83 (6): 543 – 551. <https://doi.org/10.1016/j.circen.2015.11.008>.
64. Ligouri, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in Aging*, 13, 757 – 772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
65. Liu, H.H., Ji, X.J., & Huang, H. (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology advances*, 33 (8), 1522–1546. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010>
66. Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., HersHKovitz, V., Tian, S., & Farrell, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 80 (3) , 578 - 590. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01324.x>
67. Lopes, M., Mota, M., & Belo, I. (2013). Comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* cellular response to different agents of oxidative stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170 (2), 448–458. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0205-3>
68. Lushchak, V.I. (2006). Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochimica Polonica*, 53 (4), 679–684.

69. Lushchak, V.I. (2010). Oxidative stress in yeast. *Biochemistry.Biokhimiia*, 75 (3), 281–296.
<https://doi.org/10.1134/s0006297910030041>
70. Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
71. Ma, X., Chen, Z., Wang, L., Wang, G., Wang, Z., Dong, X., Wen, B., & Zhang, Z. (2018). The pathogenesis of diabetes mellitus by oxidative stress and inflammation: its inhibition by berberine. *Frontiers in Pharmacology*, 9 (782). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00782>
72. Madamanchi, N., & Runge, M. (2005). Oxidative Stress. In: Runge M.S., Patterson C. (eds) *Principles of Molecular Cardiology. Contemporary Cardiology*. Humana Press.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00782>
73. Marroco, I., Altieri, F., & Peluso, I. (2017). Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative Stress and Cellular Longevity*, 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/6501046>
74. Martins, D., & English, A. M. (2014). Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox biology*, 2, 308– 313.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.019>

75. Matés, J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153 (1-3): 83 – 104. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00306-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00306-1)
76. Matsuda, M., & Shimomura, I. (2013). Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research & Clinical Practice*, 7 (5), e330 – e341. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.05.004>
77. Mauersberger, S., Wang, H.J., Gaillardin, C., Barth, G., & Nicaud, J.M. (2001). Insertional mutagenesis in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. *Journal of Bacteriology*, 183 (17), 5102- 5109. <https://doi.org/10.1128/jb.183.17.5102-5109.2001>
78. McKee, T., & McKee, J.R. (2015). Bioquímica las bases moleculares de la vida, (5ª ed) McGraw Hill.
79. Miranda-Roblero, H.O. (2016). El envejecimiento modifica la expresión de genes de la respuesta antioxidante en *Y. lipolytica* (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, NL.
80. Molina-Navarro, M.M., Castells-Roca, L., Bellí, G., García-Martínez, J., Marín-Navarro, J., Moreno, J., Pérez-Ortín, J.E., & Herrero, E. (2008). Comprehensive transcriptional analysis of the oxidative response in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (26), 17908–17918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800295200>
81. Moris, D., Spartalis, M., Spartalis, E., Karachaliou, G.S., Karaolanis, G.I., Tsouroufflis, G., Tsilimigras, D. I., Tzatzaki, E., & Theocharis, S.

- (2017). The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of Translational Medicine*, 5 (16). <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.27>.
82. Nakagawa, Y., Koide, K., Watanabe, K., Morita, Y., Mizuguchi, I., & Akashi, T. (1999). The expression of the pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene in response to hydrogen peroxide. *Microbiology and immunology*, 43(7), 645–651. <https://doi.org/10.1111/j.1348->
83. Nakagawa, Y., Kanbe, T., & Mizuguchi, I. (2003). Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiology and Immunology*, 47 (6), 395 – 403. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03376.x>
84. Ndisang, J.F. (2010). Role of heme oxygenase in inflammation, insulin-signalling, diabetes and obesity. *Mediators of Inflammation*, 2010,; <https://doi.org/10.1155/2010/359732>
85. Nimse, S.B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5 (35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
86. Nishimoto, T., Furuta, M., Kataoka, M., & Kishida, M. (2015). Important role of catalase in the cellular response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ionizing radiation. *Current microbiology*, 70 (3), 404–407. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0733-2>
87. Nishimoto, T., Watanabe, T., Furuta, M., Kataoka, M., & Kishida, M. (2016). Roles of catalase and trehalose in the protection from hydrogen

- peroxide toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocontrol science*, 21 (3), 179–182. <https://doi.org/10.4265/bio.21.179>
88. Ojaimi, C., Kinugawa, S., Recchia, F.A., & Hintze, T.H. (2010). Oxidant-NO dependent gene regulation in dogs with type I diabetes: impact on cardiac function and metabolism. *Cardiovascular Diabetology*, 9, 43. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-9-43>
89. Patlevic, P., Vasková, J., Svorc-Jr, P., Vasko, L., & Svorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases, *Integrative Medicine Research*, 5 (4): 250 – 258. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.07.004>
90. Paulo, E., García-Santamarina, S., Calvo, I. A., Carmona, M., Boronat, S., Domènech, A., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2014). A genetic approach to study H₂O₂ scavenging in fission yeast – distinct roles of peroxiredoxin and catalase. *Molecular Microbiology*, 92 (2), 246–257. <https://doi.org/10.1111/mmi.12548>
91. Peixoto, A., Monteiro, M., Rocha, B., & Veiga-Fernandes, H. (2004). Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome Research*, 14 (10), 1938–1947. <https://doi.org/10.1101/gr.2890204>
92. Pekmez, M., Arda, N., Hamad, I., Kig, C., & Temizkan, G. (2008). Hydrogen peroxide-induced oxidative damages in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biologia*, 63 (2); 151 – 155. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0040-0>
93. Pereira, C., Bessa, C., Soares, J., Leão, M., & Saraiva, L. (2012). Contribution of yeast models to neurodegeneration. *Journal of*

94. Perrone, G.G., Tan, S.X., & Dawes, I.W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783 (7), 1354 – 1368. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>
95. Petrova, V. Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V., & Schmitt, M. J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *The Biochemical Journal*, 380(Pt 2), 393–400. <https://doi.org/10.1042/BJ20040042>
96. Phaniendra, A., Jestadi, D.B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 30 (1): 11 – 26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
97. Pisoschi, A.M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55 – 74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
98. Pitocco, D., Zaccardi, F., Di-Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S.A., Zuppi, C., & Ghirlanda, G. (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The Review of Diabetic Studies: RDS*, 7 (1), 15 – 25. <https://doi.org/10.1900/RDS.2010.7.15>
99. Quiñones-González, C.A. (2018). Respuesta antioxidante de *Yarrowia lipolytica* en ausencia del gen CAT3. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, NL.

100. Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2 (2), 219–236.
101. Ramos-Ibarra, M.L., Batista-González, C.M., Gómez-Meda, B.C., & Zamora-Pérez, A.L. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud*, 8 (1), 7- 15.
102. Richard, G.F., Kerrest, A., Lafontaine, I., & Dujon, B. (2005). Comparative genomics of hemiascomycete yeasts: genes involved in DNA replication, repair, and recombination. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (4): 1011 – 1023. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi083>
103. Russo, A.J. (2010). Decreased serum Cu/Zn SOD associated with high copper in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Journal of Central Nervous System Disease*, 2, 9–14. <https://doi.org/10.4137/jcnscd.s4553>
104. Sánchez-Rodríguez, C., Martín-Sanz, E., Cuadrado, E., Granizo, J.J., & Sanz-Fernández, R. (2016). Protective effect of polyphenols on presbycusis via oxidative/nitrosative stress suppression in rats. *Experimental Gerontology*, 83, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.07.005>
105. Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica Sur*, 20 (3): 161 – 168.
106. San-Miguel, A., & Martin-Gil, F. J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106 (3), 106–113. [https://doi.org/10.1016/S0304-4858\(09\)74661-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4858(09)74661-X)

107. Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Intechopen*, doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>

108. Sarı, M., Akgöl, S., Karataş, M., & Denizli, A. (2006). Reversible immobilization of catalase by metal chelate affinity interaction on magnetic beads. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45 (9), 3036-3043. <https://doi.org/10.1021/ie0507979>

109. Schrader, M., & Fahimi, H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763 (12), 1755 – 1766 . <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>

110. Segal-Kischinevsky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., & Alba-Lois, L. (2011). The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. *Current Microbiology*, 62 (3), 933–943. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9806-z>

111. Semchyshyn, H. (2009). Hydrogen peroxide-induced response in *E. coli* and *S. cerevisiae*: different stages of the flow of the genetic information. *Central European Journal of Biology*, 4 (2); 142 – 153. <https://doi.org/10.2478/s11535-009-0005-5>

112. Senoner, T., & Dichtl, W. (2019). Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target. *Nutrients*, 11 (9). <https://doi.org/10.3390/nu11092090>

113. Sepúlveda-Reis, J., Araújo-Veloso, C., Teixeira-Mattos, R., Purish, S., & Nogueira-Machado, J.A. (2008). Estresse Oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52 (7), 1096 – 1105.
114. Sifuentes-Gaspar, E. (2014). Efecto genotóxico de la cafeína sobre células de *Yarrowia lipolytica* deficientes en los mecanismos de reparación del ADN (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL.
115. Sleator, R.D., Shortall, C., & Hill, C. (2008) Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology*, 47 (5), 361–366. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02444.x>
116. Smith, J.A., Park, S., Krausse, J.S., & Banik, N.L. (2013). Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochemistry International*, 62 (5), 764 – 775. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.013>
117. Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*, 12 (1), 376 – 390. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>
118. Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew, W.P., & Sulaiman-Rahman, H. (2018). Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9 (1162). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01162>

119. Tenreiro, S., & Outeiro, T.F. (2010). Simple is good: Yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Research*, 10 (8), 970–979. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00649.x>
120. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39 (1): 44 – 84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
121. Veal, E.A., Day, A.M., & Morgan, B.A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular cell*, 26 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.016>
122. Venereo-Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31 (2) 126–133. ISSN:1561-3046
123. Wysong, D. R., Christin, L., Sugar, A. M., Robbins, P. W., & Diamond, R. D. (1998). Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infection and immunity*, 66(5), 1953–1961. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.5.1953-1961.1998>
124. Xu, H., Barnes, G.T., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Tartaglia, L.A., & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 112 (12): 1821- 1830. <https://doi.org/10.1172/JCI19451>

125. Yazgan, O., & Krebs, J.E. (2012). Mitochondrial and nuclear genomic integrity after oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 17, 1079 - 1093. <https://doi.org/10.2741/3974>
126. Zamora, J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34 (1):17–26. ISSN:0717-7518
127. Ziemert, N., & Jensen, P.R. (2012). Phylogenetic approaches to natural product structure prediction. *Methods in Enzymology*, 517, 161 – 182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404634-4.00008-5>
128. Zorrilla-García, A.E., Eirez-Izquierdo, M., & Izquierdo-Expósito, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(1)51–57. ISSN:1561-301
129. Zuo, L., Prather, E.R., Stetskiv, M., Garrison, D.E., Meade, J.R., Peace, T.I., & Zhou, T. (2019). Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184472>